



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
HONGOS FITOPATÓGENOS EN CULTIVOS DE BANANO (*Musa
x paradisiaca*) EN LA ISLA SANTA CRUZ-GALÁPAGOS”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA:

ABIGAIL LUCÍA CHANCUSIG PROAÑO

Riobamba-Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
HONGOS FITOPATÓGENOS EN CULTIVOS DE BANANO (*Musa
x paradisiaca*) EN LA ISLA SANTA CRUZ-GALÁPAGOS”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: ABIGAIL LUCÍA CHANCUSIG PROAÑO

DIRECTORA: Ing. CRISTINA GABRIELA CALDERÓN TAPIA, MSc.

Riobamba-Ecuador

2023

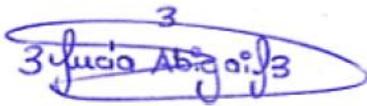
© 2023, Abigail Lucía Chancusig Proaño

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho del Autor.

Yo, CHANCUSIG PROAÑO ABIGAIL LUCÍA declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras Fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 01 de marzo de 2023

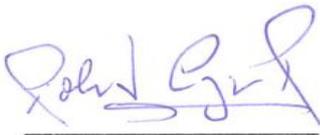
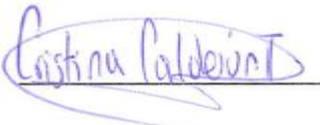


Abigail Lucía Chancusig Proaño

C.I. 050426351-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Proyecto de Investigación, “**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN CULTIVOS DE BANANO (*Musa x paradisiaca*) EN LA ISLA SANTA CRUZ-GALÁPAGOS**”, realizado por la señorita: **ABIGAIL LUCÍA CHANCUSIG PROAÑO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Robert Alcides Cazar Ramírez, PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-03-01
Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia, MSc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2023-03-01
Ing. Juan Carlos Gonzales García, PhD. ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2023-03-01

DEDICATORIA

A Dios

Dedico con todo mi corazón mi tesis a mi madre y abuelita pues sin ellas no lo habría logrado. Tu bendición madrecita a diario y a lo largo de mi vida me protege y me lleva por el camino del bien. Por eso te doy mi trabajo en ofrenda por tu paciencia y amor madre mía, te amo.

Desde el cielo mamita Enriqueta tú me cuidas y guías mi camino siempre serás vida en mi corazón con todo el amor del mundo te ama tanto tu ñetita querida, quien te extraña demasiado.

A mi padre José, hermano Xavier, cuñada Maritza y mis sobrinos queridos Mateo, Jeremy, y Helen, por ser una maravillosa familia, quienes han creído en mí siempre, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio; enseñándome a valorar todo lo que tengo. A todos ellos dedico el presente trabajo, porque han fomentado en mí, el deseo de superación y de triunfo en la vida. Lo que ha contribuido a la consecución de este logro. Espero contar siempre con su valioso e incondicional apoyo.

También se lo dedico a mis compañeritos de vida de cuatro patitas, a mis amuletos de la buena suerte, mis fieles compañeros, durante todas las noches de desvelo, que nada más bastaba verlos dormidos en mi cama o a mi lado para no sentirme sola y trabajar a gusto, gracias Nena, Osa, Happy, Félix y Forastera, que ahora estas en un lugar feliz, espérame.

Abigail

AGRADECIMIENTO

Un especial agradecimiento a todos y cada uno de los que forman la familia de La Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG), en especial a la Dra. Marilyn Cruz, directora ejecutiva, y al M. Sc. Alberto Vélez, por abrirme las puertas de ABG brindándome el apoyo y todas las facilidades para desarrollar mi proyecto de titulación.

Al Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia MSc, en calidad de tutora académica, me brindo su conocimiento, guiándome con mucha dedicación y paciencia en cada una de las etapas de la tesis.

Al Ing. Carlos Efraín Masaquiza y el Ing. Patricio Vega como cotutores, me brindaron su amistad, y apoyo, guiándome constantemente en la ejecución del proyecto.

Al Ing. Ronal Azuero como amigo, me brindo todo el apoyo y la facilidad de transporte y movilidad en los muestreos de campo.

A Rey gracias por ser no solo mi novio, sino también mi mejor amigo, cómplice, confiar en mí y apoyarme en todos y cada uno de los pasos que doy en mi vida, siempre estás ahí por y para mí. Te agradezco y deseo compartir contigo este y muchos otros momentos más importantes de mi vida.

A todos mis amigos y amigas en especial a Liliana, Gabriela, Cristofer, a quienes nunca olvidare por haber compartido momentos alegres y difíciles que formaron parte de esta etapa Universitaria.

A mi familia en especial a mis padres, por su apoyo incondicional que me motivaba a seguir siempre adelante.

Abigail

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1.	Planteamiento del problema.....	2
1.2.	Problema general de investigación.....	2
1.3.	Problemas específicos de investigación.....	2
1.4.	Objetivos.....	3
1.4.1.	<i>General</i>	3
1.4.2.	<i>Específicos</i>	3
1.5.	Justificación.....	3
1.5.1.	<i>Justificación teórica</i>	3
1.5.2.	<i>Justificación metodológica</i>	3
1.5.3.	<i>Justificación práctica</i>	3
1.6.	Hipótesis.....	4

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.	Antecedentes de investigación.....	5
2.2.	Referencias teóricas.....	6
2.2.1.	<i>Banano</i>	6
2.2.1.1.	<i>Descripción taxonómica del banano (Musa x paradisiaca)</i>	6
2.2.1.2.	<i>Descripción botánica del banano</i>	6
2.2.2.	<i>Agricultura del banano en el Ecuador</i>	8
2.2.3.	<i>La importancia del banano en las Islas Galápagos</i>	8
2.2.4.	<i>Enfermedades que afectan al cultivo de banano</i>	9
2.2.4.1.	<i>Sigatoka negra</i>	9

2.2.4.2.	<i>Sigatoka amarilla</i>	11
2.2.4.3.	<i>Fusarium</i>	12
2.2.5.	Hongos	15
2.2.5.1.	<i>Hongos fitopatógenos</i>	15
2.2.5.2.	<i>Morfología de hongos</i>	16
2.2.6.	Identificación morfológica de hongos	17
2.2.7.	Identificación de hongos mediante técnicas moleculares	17
2.2.7.1.	<i>Extracción de ADN</i>	17
2.2.7.2.	<i>Espaciadores Internos Transcritos</i>	18
2.2.7.3.	<i>Secuenciación</i>	18
2.2.7.4.	<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	19
2.2.7.5.	<i>Electroforesis</i>	20

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	21
3.1.	Enfoque de investigación	21
3.2.	Nivel de investigación	21
3.3.	Diseño de investigación	21
3.4.	Población y planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra	21
3.4.1.	<i>Ubicación</i>	21
3.5.	Métodos, técnicas e instrumentos de investigación	22
3.5.1.	<i>Condiciones climáticas</i>	22
3.5.2.	<i>Condiciones del laboratorio</i>	22
3.5.3.	<i>Mapa del área de estudio</i>	22
3.5.4.	<i>Material experimental</i>	23
3.5.5.	<i>Métodos</i>	24
3.5.6.	<i>Recolección de la muestra</i>	24
3.5.7.	<i>Obtención de cultivos puros</i>	27
3.5.7.1.	<i>Desinfección y siembra de las muestras</i>	27
3.5.7.2.	<i>Purificación del hongo</i>	28
3.5.8.	Caracterización morfológica	29
3.5.8.1.	<i>Caracterización macroscópica</i>	29
3.5.8.2.	<i>Caracterización microscópica</i>	29
3.5.9.	Identificación o caracterización molecular	29
3.5.9.1.	<i>Extracción del ADN</i>	29
3.5.9.2.	<i>Amplificación de la región ITS</i>	30

3.5.9.3.	<i>Purificación y secuenciación de los productos de PCR</i>	32
3.5.9.4.	<i>Análisis filogenético</i>	33

CAPÍTULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1.	Caracterización macroscópica y microscópica	34
4.1.1.	<i>Características macroscópicas</i>	35
4.1.2.	<i>Caracterización molecular</i>	41
4.1.2.1.	<i>Análisis Blast (Basic Local Alignment Search Tool)</i>	42
4.1.2.2.	<i>Análisis filogenético</i>	44
	CONCLUSIONES	47
	RECOMENDACIONES	48
	BIBLIOGRAFIA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Taxonomía del banano.....	6
Tabla 2-2:	Taxonomía del agente causal de Sigatoka Negra.....	9
Tabla 3-2:	Taxonomía del agente causal de Sigatoka Amarilla	11
Tabla 4-2:	Taxonomía del agente causal de Fusariosis de las musáceas.....	13
Tabla 1-3:	Ubicación política	22
Tabla 2-3:	Ubicación geográfica	22
Tabla 3-3:	Condiciones del laboratorio	22
Tabla 4-3:	Materiales.....	23
Tabla 5-3:	Equipos	23
Tabla 6-3:	Reactivos.....	23
Tabla 7-3:	Recolección de muestras.....	24
Tabla 1-4:	Resultados de la identificación morfológica de los hongos analizados	34
Tabla 2-4:	Características macroscópicas de los hongos estudiados.....	35
Tabla 3-4:	Caracterización macroscópica de las colonias obtenidas en agar PDA a 25°C ...	40
Tabla 4-4:	Número de accesión y porcentaje de cobertura e identidad de los aislamientos identificados por secuenciación de los marcadores ITS (Espacio transcrito interno)	42

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Partes de la planta de banano	8
Ilustración 2-2:	Estadios de la sigatoka negra	10
Ilustración 3-2:	Fases de la infección de la sigatoka amarilla	12
Ilustración 4-2:	Plantas de banano infectadas con de Fusariosis de las musáceas.....	13
Ilustración 5-2:	Pseudotallo de banano con una coloración café.....	14
Ilustración 1-3:	Mapa de la zona de estudio	22
Ilustración 2-3:	Diagrama metodológico de la identificación morfológica y molecular de hongos fitopatógenos en cultivos de banano en la isla Santa Cruz – Galápagos, 2021.....	24
Ilustración 3-3:	Hojas de banano afectadas	26
Ilustración 4-3:	Muestras de hojas y pseudotallo de banano	26
Ilustración 5-3:	Desinfección de las muestras	27
Ilustración 6-3:	Corte del tejido vegetal	27
Ilustración 7-3:	Purificación del hongo	28
Ilustración 8-3:	Incubación de los aislamientos puros.....	28
Ilustración 9-3:	Kit Plant PureLink kit extraction.....	30
Ilustración 10-3:	PCR	31
Ilustración 11-3:	Corrida electroforética.....	31
Ilustración 12-3:	Transluminador UV.....	32
Ilustración 13-3:	Visualización y foto documentación de las bandas de ADN	32
Ilustración 14-3:	Alineamiento de secuenciación para obtener una secuencia consenso	32
Ilustración 1-4:	Productos de PCR sobre gel de agarosa al 2 % obtenidos a partir de los amplicones de la región ITS. La primera y última fila representa al marcador de peso molecular de EasyLadder™ I. de 200 lanes.....	41
Ilustración 2-4:	Productos de PCR sobre gel de agarosa al 2 % obtenidos a partir de los amplicones de la región ITS. La primera y última fila representa al marcador de peso molecular de EasyLadder™ I. de 200 lanes.....	42
Ilustración 3-4:	Árbol filogenético derivado de la región transcrita interna (ITS), utilizando el algoritmo “Maximun Likelihood”. Los codones estuvieron basados en el alineamiento CLUSTALW del programa MEGA 11. Los valores de bootstrap (≥ 70 %) están mostrados frente a cada rama del árbol.....	45

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS AISLAMIENTOS
- ANEXO B:** ANÁLISIS BLAST (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL).
USANDO LA SECUENCIA DE LA REGIÓN DEL ESPACIO TRANSCRITO
INTERNO (ITS)
- ANEXO C:** PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN (PURELINK KIT EXTRATION
(INVITROGEN)
- ANEXO D:** SECUENCIAS DE LA REGIÓN TRANSCRITO INTERNA (ITS),
AMPLIFICADA MEDIANTE CEBADORES ITS1 E ITS4,
CORRESPONDIENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS EN CULTIVOS
DE BANANO DE LA ISLA SANTA CRUZ, GALÁPAGOS, 2021
- ANEXO E:** SECUENCIAS REFERENCIA DE LA REGIÓN TRANSCRITA INTERNA
(ITS), OBTENIDAS A PARTIR DE GENBANK

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue identificar morfológica y molecularmente los hongos fitopatógenos en cultivos de banano de la isla Santa Cruz- Galápagos. Por medio de un muestreo intencional, se recogió 217 muestras y se discriminó hasta reducir a 16 muestras, después se aisló los hongos fitopatógenos previo tratamiento de desinfección, en un medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar), a una temperatura de incubación de 25° C, en el que a partir del quinto día se observó el crecimiento de las diferentes especies. Se describió las características morfológicas como color, forma del borde, textura, elevación, y presencia de anillos, en las que se destacó las colonias similares a las especies del género *Collectotrichum sp.*, que es responsable de la antracnosis. Asimismo, se identificó molecularmente los aislamientos de hongos fitopatógenos mediante el aislamiento del ADN con Plant Pure Link kit extraction (Invitrogen), una amplificación con Master Mix DreamTaq Green (Thermo Scientific™) y cebadores (ITS1-ITS4), se procedió a la purificación de los productos de PCR, se realizó la secuenciación, se editó las secuencias y se determinó su identidad, en consecuencia, se obtuvo que 8 muestras que obtuvieron similitud de las regiones ITS de cada aislamiento en el NCI BLAST. Finalmente, Se comparó las secuencias obtenidas del aislado con accesiones del género *Colletotrichum*, disponible en GenBank y presentó el 100% de similitud en su análisis filogenético. Se concluye que una gran cantidad de plantas de banano en las fincas de la isla Santa Cruz poseen la enfermedad antracnosis siendo *Collectotrichum siamense* una especie que comúnmente es un patógeno en un amplio rango de huéspedes, por lo que se verificó la presencia de esta especie. Se recomienda estudiar otras islas de Galápagos para dimensionar la propagación de las distintas enfermedades y así generar un plan de acción frente a esta problemática.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <IDENTIFICACIÓN>, <MORFOLÓGICA>, <MOLECULAR>, <HONGOS FITOPATÓGENOS>, <CULTIVOS DE BANANO>, <ISLA SANTA CRUZ (CANTÓN)>, <GALÁPAGOS (PROVINCIA)>.



0606-DBRA-UPT-2023

ABSTRACT

This study aimed to identify morphologically and molecularly the phytopathogenic fungi in banana crops on the island of Santa Cruz-Galápagos. Through purposeful sampling, 217 samples were collected and discriminated until reduced to 16 samples; then, the phytopathogenic fungi were isolated after disinfection treatment, in a PDA (Potato Dextrose Agar) culture medium, at an incubation temperature of 25 ° C; in which from the fifth day the growth of the different species was observed. Morphological characteristics such as colour, edge shape, texture, elevation, and presence of rings were described, in which colonies similar to the species of the genus *Collectotrichum* sp., which is responsible for anthracnose, stood out. In the same way, isolates of phytopathogenic fungi were molecularly identified by DNA isolation with Plant Pure Link extraction kit (Invitrogen), amplification with Master Mix DreamTaq Green (Thermo Scientific™) and primers (ITS1-ITS4), it was purified. PCR products were obtained, sequencing was performed, the sequences were edited, and their identity was determined; consequently, eight samples were obtained that obtained similarity of the ITS regions of each isolate in the NCI BLAST. Finally, the sequences obtained from the isolate were compared with accessions of the genus *Colletotrichum*, available in GenBank and presented 100% similarity in their phylogenetic analysis. It is concluded that many banana plants in the farms of Santa Cruz Island have the anthracnose disease, *Collectotrichum siamense* being a species commonly a pathogen in a wide range of hosts; therefore, the presence of this species was verified. Studying other islands in the Galapagos is recommended to measure the spread of different diseases and thus generate an action plan to deal with this problem.

Keywords: <BIOTECHNOLOGY>, <IDENTIFICATION>, <MORPHOLOGICAL>, <MOLECULAR>, <PHYTOPATHOGENIC FUNGI>, <BANANA CROPS>, <SANTA CRUZ ISLAND (CANTON)>, <GALÁPAGOS (PROVINCE)>.



Ing. Angel Paul Obregón Mayorga, Mgs.

C.I. 060192712-2

INTRODUCCIÓN

Las Islas Galápagos son un laboratorio viviente para biólogos evolutivos, biogeógrafos y ecologistas, las peculiaridades de la vida silvestre de Galápagos intrigaron a Charles Darwin, lo que lo inició en un viaje intelectual que finalmente produjo su teoría de la evolución. La colonización de las islas por humanos trajo perturbaciones ecológicas de intensidad cada vez mayor hasta que el gobierno ecuatoriano comenzó a tomar medidas para garantizar la conservación de la biota única de las islas (Scott, 2020, p.1). Las Islas Galápagos están ubicadas 1100 km al oeste de Ecuador, el archipiélago está formado por vulcanismo inducido por puntos calientes debajo de la placa tectónica de Nazca a medida que se desplaza hacia el este a una velocidad de aproximadamente 51 km/Ma (Dinter et al., 2020, p.1). Debido a su diversa topología geológica y zona climática, la flora es rica y variada e incluye 1544 especies de plantas con flores, incluidas 241 especies endémicas (Scott, 2020, p.1). Las consecuencias del calentamiento global son una preocupación seria para los humanos, ya que se percibe que afecta a los animales y al rendimiento global de los cultivos, al aumentar la virulencia de las especies de microbios invasores patógenos. A nivel mundial, se considera que los patógenos de las plantas son responsables de hasta el 40 % de las cosechas perdidas anualmente, lo que los convierte en un factor importante en la agricultura y la seguridad alimentaria. Los efectos devastadores de los hongos sobre las plantas los ubican como el segundo patógeno más importante; por ejemplo, los hongos son responsables de una reducción de alrededor del 30 % en la producción anual de banano. Además de reducir directamente el rendimiento de los cultivos, los hongos también pueden contaminar los cultivos con micotoxinas. Las micotoxinas son toxinas producidas por hongos, que se sabe que son dañinas para la salud de humanos y animales. Según la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), hasta el 50% de los cultivos anuales del mundo están contaminados con micotoxinas. Sin embargo, las pérdidas de cultivos poscosecha, debido a los hongos, oscilan entre el 2,7% y el 33% según los cultivos de banano (*Musa x paradisiaca*). Dentro las especies toxicogénicas más comunes se encuentran *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium spp*, lo que conlleva a pérdidas económicas adicionales (Bandar, 2023, p.2).

La identificación de nuevos aislamientos de especies fúngicas a través de mecanismos moleculares tiene mayor precisión que identificarlas a través de sus características morfológicas. La identificación de especies moleculares se basa en la variación de bandas existente en la electroforesis en gel o se basa en la generación de una nueva secuencia utilizada para el análisis BLAST para encontrar similitudes entre las secuencias de especies que están disponibles en bancos de genes, como UNITE y el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (Bandar, 2023, p.6). El presente trabajo se basa en definir especies de hongos fitopatógenos en cultivos de banano y su relación evolutiva filogenética con aislados de secuencia de referencia.

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema

El sector agropecuario de Ecuador es uno de los principales ejes de la economía del país. Dentro de los principales productos agrícolas, se encuentra el plátano en sus distintas variedades, por lo que, representa el 32% del comercio del planeta, generando un fuerte impacto, tanto para el consumo del productor, como de los pobladores; además, de generar fuentes de empleo y ayudar a que el nivel ocupacional de los productores y de su familia mejore (DPNG, 2016, p.23).

Es así como, Galápagos trabaja en aumentar su producción agrícola, con el propósito de mantener el abastecimiento a sus 30000 habitantes aproximadamente (INEC, 2010; citado en Consejo de Gobierno del Régimen Especial de las Galápagos, 2013), históricamente todos los productos han sido enviados de la parte continental por vía marítima o aérea. Se estima que en las Islas Galápagos existen 24000 hectáreas para uso agropecuario, de las que actualmente se encuentra en producción efectiva 14000 hectáreas, produciendo alrededor de 600 toneladas por mes. En la parte agrícola, Galápagos se destaca en la producción de yuca, banano, maíz, tomate, pimiento, pepino, piña y diferentes tipos de hortalizas y frutas (LEISA, 2017, p.12).

Toda la producción agrícola presenta afectaciones causadas por microorganismos diversos, gracia a esto, la producción de banano se ve afectada por enfermedades como el moko del plátano (causado por bacterias), Erwinia, mal de Panamá, sigatoka negra, antracnosis (infección por hongos), nemátodos, entre otros (MAGAP, 2016, p.2). Por lo mencionado el desarrollo de este trabajo de integración curricular se busca identificar las plagas micológicas que afectan a la producción de banano que se da en la Isla Santa Cruz, Galápagos mediante su aislamiento e identificación bibliográfica.

1.2. Problema general de investigación

Enfermedades que afectan a las plantas de plátano en la isla Santa Cruz.

1.3. Problemas específicos de investigación

- Daño en la producción de plantas de plátano.
- Déficit en el eje económico de la Isla

1.4. Objetivos

1.4.1. General

- Identificar morfológica y molecularmente los hongos fitopatógenos en cultivos de banano de la isla Santa Cruz.

1.4.2. Específicos

- Realizar el muestreo de hongos fitopatógenos en cultivos de banano del sector agrícola de la isla Santa Cruz.
- Aislar los hongos fitopatógenos encontrados en las muestras de banano.
- Describir morfológicamente los hongos fitopatógenos aislados del cultivo de banano.
- Identificar molecularmente los aislamientos de hongos fitopatógenos.

1.5. Justificación

1.5.1. Justificación teórica

El plátano al ser un eje importante en el desarrollo socio económico del país, se debe considerar su cuidado, ya que, al desarrollar distintas especies en la planta puede generarse una plaga, generando pérdidas económicas. Es así que, identificar todos aquellos hongos patógenos ayuda a la prevención de enfermedades de los cultivos de categoría comercial.

1.5.2. Justificación metodológica

Para saber a qué biodiversidad de especies fúngicas, se emplea técnicas de diagnóstico morfológicas y moleculares para el reconocimiento rápido y preciso de los microorganismos presentes en los cultivos.

1.5.3. Justificación práctica

Los resultados generados en la presente investigación serán el referente de investigaciones futuras para la creación de planes preventivos, así como el desarrollo de posibles tratamientos médicos que mitiguen esta problemática.

1.6. Hipótesis

Hipótesis nula

Las plantas de plátano de la isla Santa Cruz están sujetas a especies micológicas que le generan enfermedades.

Hipótesis alternativa

Las plantas de plátano de la isla Santa Cruz no contienen especies micológicas que le generan enfermedades.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigación

En la actualidad, el cultivo del banano es el cuarto alimento más importante del mundo después del maíz, el trigo y el arroz, representando en promedio el 15% de la producción. En 2017, el volumen de exportación mundial de banano alcanzó los 18,1 millones de toneladas, esto contribuyó al desarrollo social y económico de diferentes países tropicales y tropicales, proporcionando una fuente de trabajo para diferentes regiones (Ramos, 2022, p. 14).

Ecuador sigue siendo el principal exportador mundial de banano, con el 30% del suministro mundial de banano proveniente de Ecuador y el 15% de las exportaciones totales (El productor, 2017, p.1). La producción de este cultivo se distribuye en las distintas provincias del país, siendo El Oro, Los Ríos y Guayas las provincias de mayor representación en el cultivo de banano a nivel nacional. El Oro tiene la mayor superficie de tierra cultivable con una producción total de 2.594.000 ton/año, o el 43,27% del total, le sigue Los Ríos con 1.729.220 ton/año, o el 28,84%; Guayas, con 1' 388.460 ton/año, representando el 23,16% de la producción total.

León et al. (2018, p. 5) señalan que la producción de este cultivo se distribuye en las diferentes provincias del país, siendo El Oro, Los Ríos y Guayas las más representativas del cultivo de banano del país. El Oro tiene la mayor superficie de tierra cultivable, con una producción total de 2.594.000 ton/año (43,27 %); seguido de Los Ríos, con 1.729.220 ton/año (28,84 %); Guayas, con 1.388.460 ton/año, lo que representa el 23,16% de la producción total. Las Islas Galápagos favorecen la producción de banano debido a condiciones como el clima, el suelo y la altitud. La isla Santa Cruz produjo 467 toneladas en 2014, lo que representa menos del 4,74% (SIIG, 2014, p.1).

La principal limitante de la producción de banano es que las plagas y enfermedades atacan los cultivos, afectando la productividad de las plantaciones y aumentando los costos de producción, con un fuerte impacto en la rentabilidad de la producción y la contaminación ambiental (León et al., 2018: p.5). Una de las enfermedades que más daña los cultivos y causa más del 50% de pérdidas es la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*).

A nivel mundial, el costo anual de control se estima en alrededor de \$ 3,5 mil millones, sin incluir su costo para el medio ambiente. Cuando los bananos se producen con fines de exportación, las hojas deben mantenerse libres de enfermedades, lo que se logra en parte mediante el uso de fungicidas protectores y sistémicos, lo que implica un costo anual de alrededor de \$350 millones en Estados Unidos y en Ecuador \$25 millones (Borja, 2019, p. 16).

2.2. Referencias teóricas

2.2.1. *Banano*

Es una fruta rica en diversas vitaminas, entre las que destacan las vitaminas A, B, C y minerales como el potasio y el magnesio. El banano es una planta que puede desarrollarse en una variedad de climas, incluyendo una diversidad de suelos. El crecimiento idóneo del banano ocurre a una temperatura de 18,5°C, y es capaz de vivir y crecer en cualquier época del año. Más de 150 países de todo el mundo cultivan esta planta (Abedrabbo, 2017, p. 11).

2.2.1.1. *Descripción taxonómica del banano (Musa x paradisiaca)*

Como expresa Batallas (2015, p.7) el banano se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma:

Tabla 1-2: Taxonomía del banano

Reino	Plantae
Subreino	Franqueahionta
División	Espermatophyta
Subdivisión	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Zingiberales
Familia	Musaceae
Género	Musa sp.
Especie	Musa paradisiaca L.
Nombre común	Banano

Fuente: Batallas, 2015, p.7.

Realizado por: Chancusig, A., 2022.

2.2.1.2. *Descripción botánica del banano*

- **Raíz**

Las raíces de plátano tienen forma de cordón y se producen en grupos de 3 o 4. Tienen raíces poco profundas y se distribuyen en una capa de 30-40 cm, cuya mayor concentración se encuentra entre los primeros 15-20 cm de profundidad. Las raíces son blancas, al emerger se vuelven amarillentas y duras, de 5 a 10 mm de diámetro, las longitudes varían, si no se obstaculiza su crecimiento, el crecimiento lateral puede alcanzar de 5 a 10 m y puede llegar a 1,5 m de profundidad (Pasiche, 2018, p. 3).

- **Tallo**

Es una parte de una planta que se parece al tronco de un árbol, pero en realidad es un pseudotallo, formado por un conjunto de vainas de hojas superpuestas. Aunque el pseudotallo está compuesto principalmente de agua, es muy fuerte y puede soportar un fardo de más de 50 kg. A medida que emergen las hojas, el pseudotallo continúa creciendo, alcanzando su altura máxima cuando el verdadero tallo emerge en la parte superior de la planta (Vézina, 2020, p.1).

- **Hojas**

Las hojas se originan en el punto central de crecimiento o meristema terminal, ubicado en la parte superior del bulbo, formando pecíolos y nervaduras centrales que terminan en filamentos en la etapa temprana y vainas en la etapa posterior. Externamente se observa al limbo como una lámina delgada, muy verde por encima y más o menos escarchada por debajo, que consiste en una nervadura estriada formada por venas más grandes que sobresalen por delante. Cuando aparece la inflorescencia, la producción de hojas se detiene (Pasiche, 2018, p. 4).

- **Flores**

Las flores femeninas (pistiladas) aparecen primero. En los bananos cultivados, el ovario se convierte en una fruta sin semillas por partenocarpia. Cuando brota, la bráctea expone las flores femeninas que se juntan en los nódulos y forman racimos, cuyo número depende del genotipo y las condiciones ambientales (Vézina, 2020, p.1).

A medida que las flores femeninas se convierten en frutos, la porción distal de la inflorescencia se alarga y produce racimos de flores masculinas (estaminadas), cada una debajo de una bráctea. Las flores masculinas en el capullo masculino producen polen, que puede ser estéril o no (Vézina, 2020, p.1).

Un tercer tipo de flor, llamada hermafrodita, puede aparecer en el raquis, el tallo entre las flores femeninas y el capullo masculino. Estas flores normalmente no se convierten en frutos y sus estambres no producen polen (Vézina, 2020, p.1).

- **Frutos**

Fao (2016, p.1) declara que los bananos vienen en diferentes formas y colores, y en realidad hay más de 1000 variedades. El más común, y en el que se basa la industria del banano comercial, es el banano Cavendish, dulce y que constituye el 95% de todos los bananos comerciales, no tiene semillas y, por lo tanto, es muy apto para el consumo. Sin embargo, la ausencia de esta semilla

también es sinónimo de esterilidad: no puede reproducirse mediante el proceso normal de siembra.

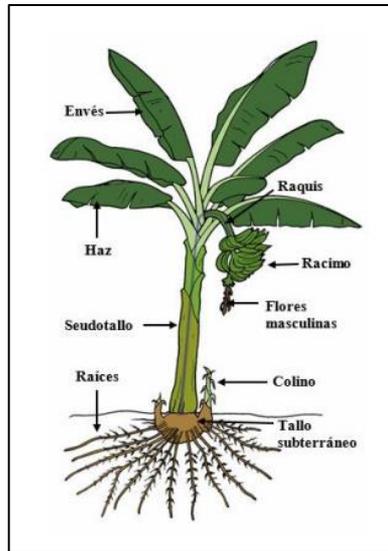


Ilustración 1-2: Partes de la planta de banano

Fuente: Medina, 2019, p. 15.

2.2.2. Agricultura del banano en el Ecuador

La superficie nacional de siembra es de unas 230.000 hectáreas, distribuidas principalmente en las provincias de Guayas, Los Ríos y El Oro, que concentran cerca del 92% de la producción total del país (INIAP, 2010, p.1).

Esta planta es muy importante en la economía del país ya que representa hasta el 50% del PIB agrícola. Del PIB total, las exportaciones de banano representaron alrededor del 4%, alcanzando los \$1.017 millones (Abedrabbo, 2017, p. 11).

En 2015, alrededor del 50% de las exportaciones de banano de Ecuador se dirigieron a países como Rusia, Estados Unidos y Alemania. Se estima que la importancia del banano es tal que todas sus actividades y cadena de valor generan empleo para aproximadamente dos millones de personas (Abedrabbo, 2017, p. 11).

2.2.3. La importancia del banano en las Islas Galápagos

Cajal (2017, p.1) indica que los productos cultivados en las Islas Galápagos se utilizan principalmente para el consumo local. Si bien son importantes en la región, su impacto está a años luz del turismo, que es la principal fuente de riqueza de las islas. Cabe agregar que el desafío de las Islas Galápagos es incrementar su producción sin dañar el ecosistema de la región.

El banano tiene un gran impacto económico, social y cultural ya que es un cultivo muy lucrativo y su fuerte poder económico tiene un gran impacto en la economía, una ventaja importante de este cultivo es que ha generado una gran cantidad de empleos (Fao, 2016, p.1).

2.2.4. Enfermedades que afectan al cultivo de banano

El cultivo de banano es susceptible a una serie de enfermedades y, según la variedad, los efectos de las enfermedades pueden ser graves y, en ocasiones, provocar la pérdida de toda la cosecha.

2.2.4.1. Sigatoka negra

La Sigatoka negra es la enfermedad más destructiva de las hojas de banano y se encuentra en casi todo el mundo.

El agente causal de la sigatoka negra del banano es un hongo cuya clasificación se detalla a continuación:

Tabla 2-2: Taxonomía del agente causal de Sigatoka Negra

Fase sexual		Fase asexual	
Reino	Fungi	Reino	Fungi
División	Eumycota	División	Eucota
Subdivisión	Ascomycotina	Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Loculoascomycetes	Clase	Hyphomycetes
Orden	Dothideales	Orden	Moniliales
Familia	Dothideaceae	Familia	Dematiaceae
Género	<i>Mycosphaerella</i>	Género	<i>Cercospora</i>
Especie	<i>Fijiensis var. diformis</i>	Especie	<i>Fijiensis var. diformis</i>

Fuente: Agrios, 1996, p.838.

Realizado por: Chancusig, A., 2022.

Es una enfermedad que inicialmente afecta el envés de las hojas, formando lesiones necróticas o manchas con halos amarillos y centros de color gris claro en grandes áreas del tejido foliar. Ataca a la planta en las hojas más jóvenes y por lo tanto causa mayor daño a los tejidos fotosintéticos (Freitez, 2007, p. 22). La mancha avanza en su desarrollo y evolución, se hace más grande y ancha en forma de óvalo, y está rodeada por un borde marrón oscuro visible cuando las hojas están húmedas. Después de esta etapa, la mancha se seca en el centro, se vuelve gris y se hunde; la lesión está rodeada por un borde negro estrecho y claro. Cuando todas las lesiones se unen, las hojas se vuelven negras y mueren a las 3 o 4 semanas de aparecer los primeros síntomas (Freitez, 2007, p. 22).

- **Síntomas**

Freitez (2007, p. 22) declara que existen 6 estadios de esta enfermedad según la escala de Fourré, los cuales se presentan a continuación:

Estadio I: pequeñas lesiones apenas visibles en el envés de la hoja.

Estadio II: rayas de color marrón de 4 mm de longitud.

Estadio III: las rayas marrones se vuelven más marrones y su longitud aumenta a 2 cm.

Estadio IV: aparecen manchas marrones ovaladas en el envés y manchas negras en el haz de la hoja.

Estadio V: El centro de la mancha se ha hundido y las zonas húmedas ahora son más claras con un halo amarillo.

Estadio VI: El centro de la mancha es gris pálido y seco, rodeado por un anillo negro claro rodeado por un halo amarillo.

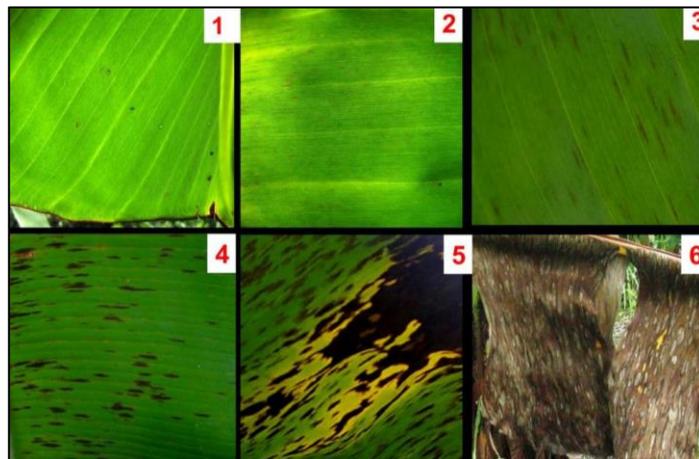


Ilustración 2-2: Estadios de la sigatoka negra

Fuente: Rivas, 2017, p.1.

La mancha negra es una enfermedad policíclica típica en la que tanto los conidios como las ascosporas desempeñan un papel en la transmisión de la enfermedad. Se producen más abundantemente durante períodos de alta humedad, especialmente si las hojas tienen una película de agua libre. Los conidios no son dispersados por el viento, sino por las salpicaduras de lluvia y la escorrentía de la superficie de la hoja (Freitez, 2007, p. 22).

- **Control**

El control de esta enfermedad involucra principalmente el uso de fungicidas y aplicaciones aéreas, los cuales tienen diferentes mecanismos de acción contra este patógeno. La rotación adecuada de estos fungicidas puede controlar la enfermedad y evitar su adaptación a los agentes químicos. El

uso de estos fungicidas incrementa los costos de producción entre un 30 y un 40 % (Abedrabbo, 2017, p. 12).

2.2.4.2. *Sigatoka amarilla*

La "mancha amarilla" es causada por el hongo *Mycosphaerella musicola* (Leach) y se presenta en regiones donde la precipitación anual supera los 1000 mm y la temperatura promedio es de 25 °C (Rocha et al., 2010: pp. 351- 352).

Tabla 1-2: Taxonomía del agente causal de Sigatoka Amarilla

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycota
Clase	Dothideomycetes
Orden	Capnodiales
Familia	Dothideaceae
Género	<i>Mycosphaerellaceae</i>
Especie	<i>Mycosphaerella musicola</i>

Fuente: Mycobank, 2017, p. 1.

Realizado por: Chancusig, A., 2022.

- Síntomas

Como señala Pérez (2020, p. 9) las fases de infección de estos fitopatógenos son las siguientes:

- a. La enfermedad comienza como pequeñas manchas amarillas o líneas paralelas en las nervaduras laterales de la hoja.
- b. Después de unos días, las manchas crecen hasta 1 o 2 cm y se vuelven marrones con un centro gris claro.
- c. Una vez que estas manchas crecen, el tejido circundante se vuelve amarillo y muere.
- d. Las manchas adyacentes se unen para agrandarse y estas áreas mueren en las hojas.
- e. En infecciones graves, toda la hoja morirá en unas pocas semanas.

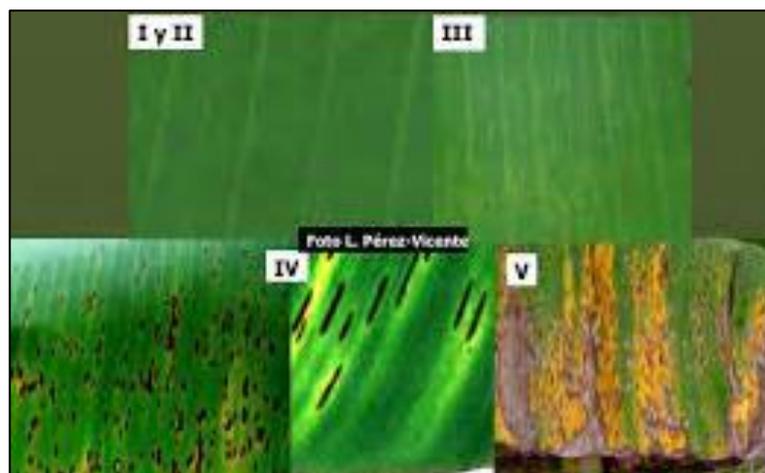


Ilustración 3-2: Fases de la infección de la sigatoka amarilla

Fuente: Pérez, 2020, p. 9.

Como se muestra en la ilustración 03-2, las lesiones destruyen las hojas maduras, dejando pocas hojas sanas; otro tipo de daño es el desgaste de vitalidad de la plantación por el impacto en los bulbos y pseudotallo (Agrios, 2005, pp. 1-922).

- Control

Usualmente para el control de esta enfermedad se utilizan enemigos naturales, antagonistas o competidores u otros organismos para el control de plagas, los cuales están relacionados con los métodos de control biológico utilizados para el control de malezas y otras plagas forestales (FAO, 2012, p.71).

Diversos estudios plantean que el hongo *Trichoderma harzianum* posee metabolitos benéficos capaces de combatir enfermedades de las plantas como la Sigatoka Amarilla (*Mycosphaerella Musicola Leach*), esta es una alternativa que tiene poco impacto ambiental, bajo costo y no daña la salud humana a gran escala (López, 2012, p. 1).

2.2.4.3. *Fusarium*

Lo que comúnmente se conoce como Fusariosis de las musáceas es una enfermedad que afecta a las plantaciones de banano y plátano. Es causada por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* raza 4 tropical, vive en el suelo y forma estructuras resistentes que le permiten sobrevivir más de 30 años, lo que dificulta su manejo (ICA,2019, p.1).

Tabla 4-2: Taxonomía del agente causal de Fusariosis de las musáceas

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i> raza 4 tropical

Fuente: SENASICA, 2019, p. 3.

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

- Síntomas

a) *Externo*

Los síntomas externos que produce esta enfermedad se identifican por un amarillamiento uniforme de las hojas adultas a lo largo de los márgenes de las hojas, que se extiende hacia el nervio central de la hoja hasta secarse por completo y se vuelve marrón; puede o no tener grietas en la base del pseudotallo. Posteriormente, todas las hojas se marchitan, cuelgan de la planta y se adhieren al pseudotallo (Pérez-Vicente et al., 2014: pp. 4-22).



Ilustración 4-2: Plantas de banano infectadas con de Fusariosis de las musáceas

Fuente: DGSV-DCNRF 2021, pp. 5-6.

b) Interno

Se caracterizan por cambios en el color de los haces vasculares observados al cortar raíces, bulbos o pseudotallo. Esta decoloración (amarillo o marrón oscuro) del tejido vascular progresa hacia los haces vasculares del pseudotallo, a veces hacia el eje (Pérez-Vicente et al., 2014: pp. 4-22).

Se observan líneas marrones, rojas o amarillas al cortar verticalmente el pseudotallo de una planta infectada con el hongo *Fusarium*; en corte transversal se observan en forma de anillos. Si un rizoma se contamina con *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* R4T se observan manchas amarillas y filamentos (DGSV-DCNRF 2021, pp. 5-6).



Ilustración 5-2: Pseudotallo de banano con una coloración café

Fuente: DGSV-DCNRF 2021, p. 5.

Las plantas infectadas a menudo mueren antes de que se produzcan los racimos, por lo que la enfermedad puede reducir significativamente los rendimientos en los campos afectados. Además, el patógeno produce esporas persistentes de paredes gruesas que contaminan el suelo durante largos períodos de tiempo. Se ha informado que sobrevive incluso en ausencia de bananos y especies de malezas no hospedantes (García-Bastidas et al., 2015: p. 17).

- Control

Como señalan García-Bastidas et al. (2015, p.:17), los medios de control químicos y físicos no están disponibles y, por lo tanto, los esfuerzos se han centrado en estrategias de control cultural y exclusión y cuarentena, tales como:

- a) Uso de material de siembra libre de enfermedades (preferiblemente plantas cultivadas "in vitro").

- b) Plantar en suelo que no albergue la enfermedad si hay antecedentes de plantas infestadas, no realizar movimientos de tierra en áreas donde se hayan descubierto plantas enfermas.
- c) Añadir de 1 a 2 kg/planta de hidróxido de calcio (“cal hidratada”) a las plantas sintomáticas. Además de neutralizar el exceso de ácido, evita que el inóculo se disperse y provoque un aumento repentino del pH, lo que frena el crecimiento de hongos. Es necesario hacer este ejercicio lo antes posible para aumentar su eficacia. El hidróxido de calcio se puede aplicar convenientemente de manera profiláctica a las plantas cercanas a la planta enferma para evitar la dispersión del inóculo.
- d) Las plantas de cultivos "in vitro", o "niños" o "cabezas" no deben ser replantadas en áreas con antecedentes de la enfermedad, ya que pueden contaminarse con hongos. Las soluciones para compensar la pérdida de plantas son dejar "pesas" de plantas sanas adyacentes o retoños fuertes para seleccionar las plantas afectadas durante los meses de verano.
- e) Lo principal es evitar inundaciones y mantener una adecuada humedad del suelo durante el cultivo, ya que las plantas enfermas consumen menos agua que las plantas sanas, por lo que se deben ajustar las tasas de riego para reducir la cantidad de agua que llega.

Todas estas medidas, y algunas otras, no controlarán la enfermedad por sí solas, pero la suma de todas ellas controla efectivamente el hongo (Pyhytoma, 2019, p.1).

2.2.5. Hongos

Avilés y Granja (2014: p.17) definen a los hongos como organismos pequeños, generalmente microscópicos, que carecen de clorofila y tejido conductor. La mayoría de las 100.000 especies conocidas son estrictamente saprofitas, se alimentan de materia orgánica muerta y la descomponen.

2.2.5.1. Hongos fitopatógenos

Son aquellos hongos que son capaces de destruir físicamente los tejidos, alterar la fisiología de la planta y reducir el crecimiento de toda la planta o de órganos específicos (Batallas, 2015, p.16).

Cerca de 8.000 especies de hongos causan enfermedades en las plantas, aquellas que se reproducen únicamente cuando establecen algún tipo de asociación con la planta que actúa como huésped durante todo su ciclo de vida se denominan parásitos obligados o biótrofos, y los parásitos no obligados o necrótrofos son los que requieren hongos de una planta huésped (Avilés y Granja, 2014: p.17).

Los biótrofos pueden crecer y reproducirse permaneciendo en la planta huésped durante todo su ciclo de vida, viviendo y recibiendo nutrientes sin causar la muerte. Mientras que los necrótrofos

requieren plantas anfitrionas como parte de su ciclo de vida, Estos pueden crecer en el tejido muerto o causar la muerte celular para absorber los nutrientes del tejido muerto (Batallas, 2015, p.16). Muchas infecciones comienzan en una fase biotrófica y luego se vuelven necrotróficas. Algunos hongos son simbioses facultativos que pueden crecer tanto libremente como en asociación con plantas, mientras que otros son simbioses obligados que solo pueden crecer en asociación con plantas (Batallas, 2015, p.16).

2.2.5.2. *Morfología de hongos*

Los hongos son organismos con características muy específicas, a diferencia de las plantas en que no fabrican su propio alimento a través de la fotosíntesis, sino que como se mencionó anteriormente, sobreviven a expensas de otros organismos vivos o muertos. Representan un grupo de seres vivos que pueden consistir en una célula (organismos unicelulares) o muchas células (organismos multicelulares) (Estrada y Ramírez, 2019: p. 40).

Según Portillo (2018, p.1), los micólogos clasifican a los organismos según sus características físicas, por lo que las 3 formas diferentes de hongos son:

- Hongos filamentosos

Toda la estructura de los hongos filamentosos consiste en hifas, producto de la reproducción asexual. Esta estructura se llama micelio, el micelio de las setas silvestres puede extenderse varios metros bajo tierra. Todos los micelios subterráneos se reproducen asexualmente. Sólo las hifas que emergen hacia la superficie terrestre tienen estructuras especializadas para la reproducción sexual (Portillo, 2018, p.1).

- Levaduras

Este tipo tiene una morfología más o menos esférica. Son microscópicos y unicelulares. La mayoría de las veces, se reproducen asexualmente por varios métodos, como la brotación y la escisión.

Aunque son organismos unicelulares, dependiendo del sustrato sobre el que se desarrollen, pueden producir hifas, pero no septos verdaderos (Portillo, 2018, p.1).

- Morfología de los hongos: transformaciones del micelio

Según Portillo (2018, p.1) existen hongos que pueden cambiar su micelio a medida que maduran las hifas, como:

Plasmodio: son hongos cuyos núcleos no están separados por una membrana, sino que están sumergidos en el citoplasma.

- a) *Plecténquima*: las hifas se organizan en el tejido de manera entrelazada.
- b) *Haustorios*: pueden penetrar en el interior de las células vegetales y vivir en ellas como parásitos.
- c) *Rizomorfos*: son hongos que proyectan hifas en los troncos de algunos árboles. Son estructuralmente muy resistentes.
- d) *Conidióforos*: son hongos compuestos por hifas simples con estructura simple.
- e) *Esporangióforos*: es un hongo con micelio separado e hifas bien ramificadas. Un extremo de la hifa tiene una protuberancia llamada esporangio.

2.2.6. Identificación morfológica de hongos

La identificación de los hongos se logra mediante estudios microscópicos de la morfología de su micelio, la estructura fructífera, y las esporas. Para identificar estructuras morfológicas, es necesario observar la formación de estructuras reproductivas como esporas o conidios con alta definición y contraste. Para esto, se utilizan varios compuestos que pueden demostrar los detalles de las células fúngicas (Avilés y Granja, 2014, p. 30).

Para identificar correctamente los hongos, es importante utilizar claves taxonómicas para identificar el género y la especie (Agrios, 2015, pp. 1-922).

Los ensayos tradicionales basados en la observación de estructuras morfológicas y propiedades fisiológicas son insuficientes para la identificación confiable de ciertos hongos (Aguin et al., 2001, p. 45).

2.2.7. Identificación de hongos mediante técnicas moleculares

2.2.7.1. Extracción de ADN

Dado que la molécula de ADN es el analito que se utilizará para la amplificación, su pureza final determinará el éxito de la reacción de PCR; para la extracción de ADN, primero se debe realizar la lisis celular, utilizando sales caotrópicas para romper la estructura tridimensional de la proteína (Romero et al., 2014: pp. 1- 26).

Para degradar los restos de proteínas asociadas al ADN, se puede usar una solución de proteasa o se puede agregar una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, el fenol precipita la proteína y el cloroformo resuspende el ADN (Romero et al., 2014: pp. 1- 26). Cuando la proteína está parcialmente degradada, se inicia la purificación del ADN en etanol o isopropanol fríos, ya que

el ADN no es soluble en estas soluciones; por centrifugación, el ADN sedimenta en un sedimento que debe ser purificado mediante lavados sucesivos con alcohol (Romero et al., 2014: pp. 1- 26).

El ADN debe almacenarse en una solución tampón Tris/EDTA para la conservación a largo plazo de las moléculas, porque Tris proporciona un pH de 8, lo que reduce la actividad de la nucleasa, mientras que el EDTA funciona solo uniéndose a los cationes que utilizan, por lo que permanece inactivo (Cold Spring Center Harbor Laboratory DNA Learning, 2014, pp.1-28).

2.2.7.2. *Espaciadores Internos Transcritos*

El espaciador transcrito intrarribosómico es importante en el procesamiento del ARNr y forma estructuras secundarias específicas que se requieren para el reconocimiento correcto de los sitios de unión a proteínas para la formación de nucleoproteínas y ARN durante la maduración del ribosoma (Korabecna, 2007, pp. 783-787).

Por esta razón, estas regiones son útiles para la sistemática molecular a nivel de especie e incluso dentro de cada especie. Además, los espaciadores transcritos ribosomales internos son regiones candidatas para códigos de barras genéticos debido a su variabilidad y su fácil acumulación de mutaciones (Korabecna, 2007, pp. 783-787).

Los ITS se caracterizan por la inclusión de dos regiones no codificantes variables, denominadas ITS1 e ITS2, ubicadas dentro de repeticiones de ADN altamente conservadas separadas por ARNr 5.8S. ITS1 se encuentra entre el gen de ARNr de la subunidad pequeña 5.8S y el gen de ARNr de la subunidad grande ribosómica 18S, mientras que ITS2 se encuentra entre el gen de ARNr 5.8S y el gen de ARNr 28S (Guevara et al., 2004: pp.371-378).

2.2.7.3. *Secuenciación*

Es el proceso que se le da al ADN tras la reacción de PCR para conocer la secuencia de las bases nitrogenadas que componen la cadena del ADN (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano, 2015, p.1).

- **Secuenciación Sanger**

El método incluye la síntesis de una hebra de ADN complementaria a una sola hebra utilizada como plantilla; En esta reacción participan la ADN polimerasa, 4 2'-desoxinucleótidos (dNTP) y 4 didesoxinucleótidos (ddNTP), nucleótidos de parada que carecen de un grupo 3'-OH (Fuertes y Mallitasig, 2018, p.16).

Vázquez (2016, p.1) plantea que este método realiza 4 reacciones diferentes en diferentes tubos, cada reacción tendrá la misma plantilla de ADN, ADN polimerasa, cebadores específicos de

secuencia radiomarcados, nucleótidos normales y didesoxinucleótidos, cada tubo de ensayo corresponde a una base que contiene nitrógeno.

Comienza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la que la ADN polimerasa añade nucleótidos a la hebra molde unidos por cebadores radiactivos que añaden dNTPs, hasta que se incorporan aleatoriamente ddNTPs, interrumpiendo la reacción, de forma que en cada tubo habrá fragmentos de secuenciación de diferentes tamaños (Brunstein, 2017, p.1).

Los resultados de la reacción se muestran mediante electroforesis capilar en un gel de acrilamida, con cada fragmento interrumpido por los ddNTP marcados que atraviesan el capilar hasta llegar a la cámara del detector, donde el láser excita el fluoróforo, que emite una fluorescencia de un color específico al que se le asigna el nombre de la base correspondiente y cuyo orden revela la secuencia del ADN (Fuertes y Mallitasig, 2018, p.16).

2.2.7.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Conocido como PCR, es un método de detección enzimático desarrollado por el Dr. Kary Mullis en la década de 1980 para obtener múltiples copias de fragmentos de ADN diana a partir de trazas de ADN, el método requiere, además de moléculas de ADN, una ADN polimerasa, nucleótidos y cebadores (Garibyan y Avashia, 2013: pp. 1-3). Los cebadores, también conocidos como primers, consisten en fragmentos cortos de ADN con una secuencia específica que define la secuencia que se amplificará a partir del ADN objetivo, proporciona señales de inicio y finalización para la ADN polimerasa y, una vez que se reconocen estas secuencias, los nucleótidos complementarios comienzan a enlazarse el ADN molde. Dado que las ADN polimerasas pueden agregar nucleótidos de grupos 3'-OH preexistentes, los cebadores hacen esto al permitir la delineación de regiones específicas de la secuencia molde (Garibyan y Avashia, 2013: pp. 1-3).

Los componentes anteriores se mezclan en un tubo o placa en las concentraciones adecuadas y se colocan en un termociclador, un dispositivo que crea diferentes ciclos de temperatura en pasos preprogramados (Garibyan y Avashia, 2013: pp. 1-3).

Cada análisis de PCR consta principalmente de tres ciclos, el primero de los cuales se denomina desnaturalización, en el que se eleva la temperatura por encima del punto de fusión (92 - 96 °C) de las dos cadenas de ADN que las separan, y luego se baja la temperatura para permitir que los cebadores interactúen con el ADN, fase llamada hibridación (50 – 60 °C), y finalmente se vuelve a subir la temperatura (72 °C) para que la ADN polimerasa extienda los cebadores, añada nucleótidos y sintetice el producto de la PCR. (Brunstein, 2013, p.1).

2.2.7.5. *Electroforesis*

Esta es la forma de confirmar la presencia o ausencia de ADN y productos de PCR, ya que los geles de agarosa consisten en agregados de Ly D-galactosa unida no covalentemente que forman una red en la que el tamaño de los poros determina cómo pueden atravesar los fragmentos de ADN (Lee et al., 2012, p.1).

El producto de ADN o PCR se carga con tampón de carga en pocillos preformados en gel de agarosa, el cual se coloca en la cámara de electroforesis para generar un campo eléctrico desde el cátodo negativo hacia el ánodo positivo, a través de un tampón conductor, el ADN se carga negativamente debido a su columna vertebral de fosfato, por lo que migra al ánodo en un campo eléctrico (Instituto Nacional de Salud del Perú, 2003, pp. 1-69).

Para visualizar los productos de PCR o el ADN, se agregan colorantes químicos (fluoróforos) al gel, que se intercalan entre las cadenas de ADN de doble cadena. El bromuro de etidio se ha utilizado como colorante en el pasado, pero actualmente se utiliza Sybr Safe (C₂₈H₂₈N₂O₃S₂), que absorbe la luz azul con una longitud de onda máxima de 509 nm y emite luz verde con una longitud de onda de 524 nm (Garibyan y Avashia, 2013: pp. 1-3).

La velocidad a la que el ADN migra depende de la concentración de agarosa en el gel, el tamaño de la molécula de ADN, el tipo de agarosa, el tampón de funcionamiento (conductor eléctrico), el voltaje aplicado y la conformación del ADN (Lee et al., 2012, p.1).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Enfoque de investigación

De acuerdo con la naturaleza de la investigación se da un enfoque cualitativo, ya que, se pretende identificar los hongos fitopatógenos en cultivos de banano (*Musa x paradisiaca*) en la Isla Santa Cruz, Galápagos, mediante la recolección de muestras para su análisis e interpretación.

De forma que se procuró describir, explicar, predecir, comprender e interpretar de manera subjetiva la estructura morfológica y molecular de los hongos fitopatógenos encontrados, mediante fuentes bibliográficas confiables partiendo de lo particular a lo general.

3.2. Nivel de investigación

La línea de investigación del presente trabajo posee un nivel exploratorio, ya que, se determinó muestras en un espacio geográfico y temporal determinado. Por lo que, se estableció parámetros de manera programada, planeada, consiente, y controlada. Para finalmente interpretar los resultados de una forma constructivista.

3.3. Diseño de investigación

Se realizó una investigación experimental, para cumplir con el objetivo de identificar morfológica y molecularmente los hongos fitopatógenos en cultivos de banano de la isla Santa Cruz, por lo que, se toma las variables en un contexto natural.

3.4. Población y planificación, selección y cálculo del tamaño de la muestra

3.4.1. Ubicación

La investigación se realizó en los laboratorios de Fitopatología y Biología Molecular (LABGAL) de la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena de Galápagos (ABG), en la Isla Santa Cruz.

3.5.4. Material experimental

Tabla 4-3: Materiales

Placas Petri de vidrio	Pinzas estériles
Tijera grande	Fundas ziploc
Fundas de polietileno	Mechero de bunsen
Machete	Sistema de posicionamiento global (GPSMAP® 64s)
Tubos de microcentrifuga de 1.5 y 2 ml	Hojas de bisturí
Pinzas	Porta y cubreobjetos
Parafilm	Marcadores permanentes
Servilletas estériles	Probeta de vidrio 500 ml
Micropipeta de 100-1 000 µl	Micropipeta de 100-200 µl
Micropipeta de 10-20 µl	Gotero
Guantes de látex	Bata de laboratorio
Calculadora	Libreta de notas
Esferográfico, lapicero	Palillos de madera

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

Tabla 5-3: Equipos

Congelador (Whirlpool)	Cabina-PCR (ESCO)
Cabina de bioseguridad (BIOAIR)	Cabina de flujo laminar (BIOAIR)
Vortex Mixer (LABNET)	Fisher Vortex (Fisher Scientific)
Termociclador (LABNET)	Bloque térmico (Thermo scientific)
Balanza analítica (Dever Instrument)	Fuente de poder (Fisher Scientific)
Cámara de electroforesis BIO RAD (Fisher Scientific)	Sistema de electroforesis horizontal (LABNET)
Transluminador UV (LABNET)	Congelador (SMC)
Refrigerador	Microcentrifuga refrigerada (LABNET)
Microcentrifuga (LABNET)	Cámara de flujo (LABCONCO)
Refrigerador (Electrolux)	Incubadora a 25 °C (POL-EKO APARATURA)
Microscopio (OLYMPUS)	Unidad de alimentación (OLYMPUS)

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

Tabla 6-3: Reactivos

Agar Papa Dextrosa (PDA) (39g/L)	Cápsulas de cloranfenicol
Azul de lactofenol	Alcohol 70 %
Etanol 75 %	Hipoclorito de sodio al 5 %
Fenol-cloroformo-alcohol isoamil (25:24:1)	Alcohol Isoamílico
Isopropanol	Agua destilada
Buffer TRIS	Buffer TE
ARNasa	Proteinasa K
DreamTaq Green PCR Master Mix	Cebadores (ITS1, ITS4) (Invitrogen, EEUU)
Agarosa	Marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen)

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

3.5.5. Métodos

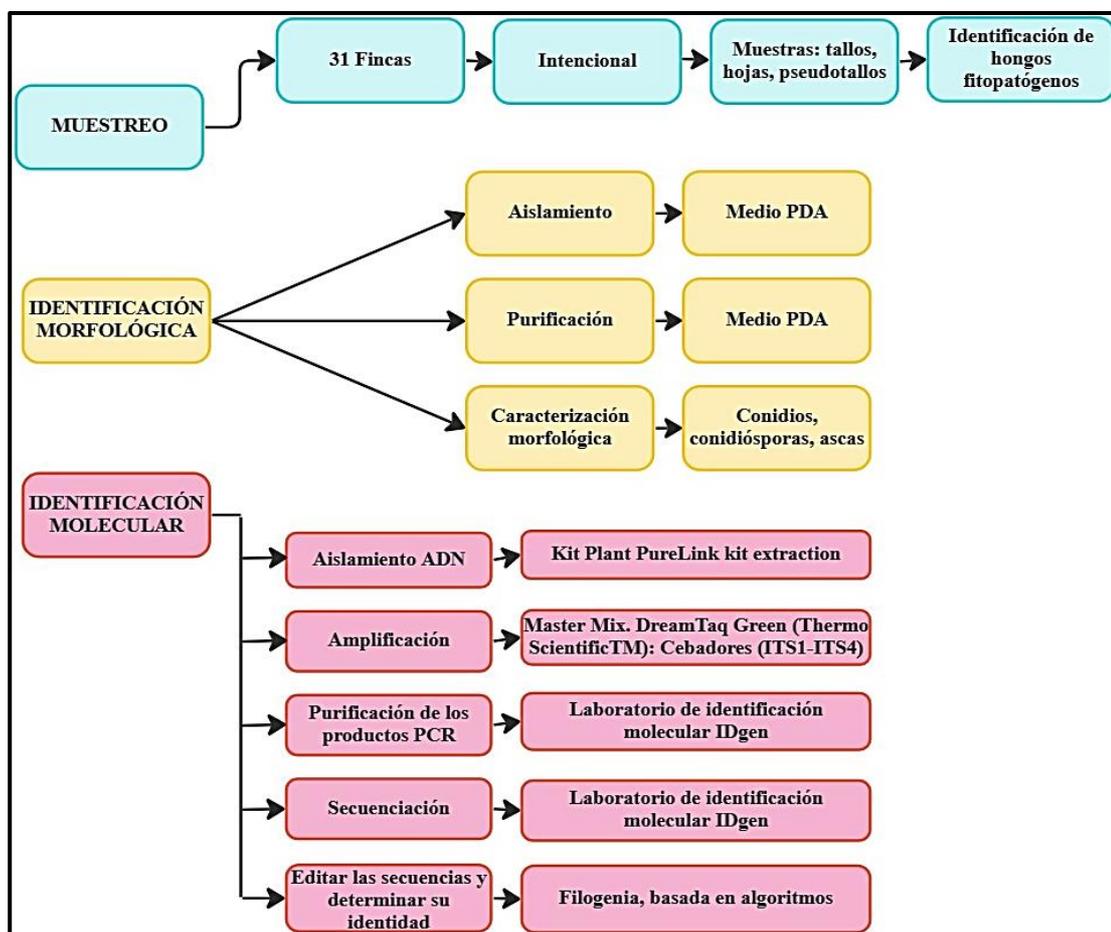


Ilustración 2-3: Diagrama metodológico de la identificación morfológica y molecular de hongos fitopatógenos en cultivos de banano en la isla Santa Cruz – Galápagos, 2021

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

3.5.6. Recolección de la muestra

Las muestras fueron recolectadas en 8 sectores de la parte agrícola de la isla Santa Cruz: El Carmen, El Occidente, El casco, Santa Rosa, Bellavista, El Camote, Tomás de Berlanga y Salasaca. Se recolectó en 31 fincas y de cada puto un total aproximado de 5-9 muestras, dando como resultado un aproximado de 217 muestras tomadas. Tal como se describe en la **tabla 07-3:**

Tabla 7-3: Recolección de muestras

SECTOR	FINCA	MUESTRAS
El Cascajo	1	4
	2	4
	3	6

	4	9
	5	5
SECTOR	FINCA	MUESTRAS
El Carmen	6	5
	7	8
	8	6
	9	7
SECTOR	FINCA	MUESTRAS
El Camote	10	5
	11	5
	12	8
SECTOR	FINCA	MUESTRAS
El Occidente	13	4
	14	4
SECTOR	FINCA	MUESTRAS
Bellavista	15	5
	16	6
SECTOR	FINCA	MUESTRAS
Tomás de Berlanga	16	4
	18	4
	19	3
SECTOR	FINCA	MUESTRAS
Santa Rosa	20	4
	21	7
	22	5
	23	5
	24	7
	25	5
SECTOR	FINCA	MUESTRAS
Salasaca	26	7
	27	7
	28	5
	29	4
	30	5
	31	4

Realizado por: Chancusig, A., 2023.



Ilustración 3-3: Hojas de banano afectadas

Realizado por: Chancusig, A., 2023.



Ilustración 4-3: Muestras de hojas y pseudotallo de banano

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

El muestreo fue intencional ya que se escogieron cultivos que presentaban lesiones (manchas foliares necróticas), principalmente hojas, tallos y frutos. Las hojas afectadas fueron cortadas con una tijera podadora por el pecíolo, los pseudotallos se cortó de las plantas más afectadas, tal como la ilustración 03-3. Las tijeras podadoras utilizadas fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70 % antes de cada toma de muestra. Las muestras fueron colocadas individualmente en fundas tipo “ziploc” nuevas. Cada muestra fue etiquetada adecuadamente y trasladadas inmediatamente, hasta el LABGAL como se visualiza en la ilustración 04-3.

3.5.7. *Obtención de cultivos puros*

3.5.7.1. *Desinfección y siembra de las muestras*

La desinfección de las muestras se basó en el procedimiento reportado por (AGRIOS, 2005) para lo cual se efectuaron cortes pequeños de los tejidos vegetales afectados de 3x3 mm a partir del borde de la lesión con un bisturí estéril y se los colocó en etanol al 70% por 5 minutos, hipoclorito de sodio al 1% por 8 minutos (Ilustración 05-3 y 06-3). A continuación, los cortes fueron retirados asépticamente con una pinza estéril y colocados en dos vasos de precipitación para realizar dos lavados en agua estéril. La pinza fue esterilizada con el mechero antes y después de su uso. Finalmente, los cortes del tejido fueron colocados en un papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua. Los cortes del tejido vegetal esterilizado fueron colocados en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (APD). Las cajas Petri fueron selladas con parafilm para evitar pérdida de humedad y contaminación de hongos ambientales y se incubaron a 25°C por 5 días.



Ilustración 5-3: Desinfección de las muestras

Realizado por: Chancusig, A., 2023.



Ilustración 6-3: Corte del tejido vegetal

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

3.5.7.2. Purificación del hongo

Cuando se observó presencia de micelio, se cortó el pedazo de agar con el borde de la colonia en crecimiento con un bisturí previamente esterilizado. El pedazo de agar fue colocado en cajas Petri con nuevo medio de cultivo PDA (Ilustración 7-3) (Galván Quintero, 2018).

Esto se realizó con el fin de evitar la proliferación de aquellos agentes contaminantes que hayan resistido la desinfección y que debido a su crecimiento más rápido pueden impedir el desarrollo adecuado de los hongos, realizando este procedimiento de dos a cuatro veces hasta obtener aislamientos puros, evidenciándose luego de los 5 días de incubación a 25 °C (Ilustración 8-3).



Ilustración 7-3: Purificación del hongo

Realizado por: Chancusig, A., 2023.



Ilustración 8-3: Incubación de los aislamientos puros

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

3.5.8. Caracterización morfológica

3.5.8.1. Caracterización macroscópica

La caracterización macroscópica consistió en visualizar el color, forma del borde, textura, elevación, y presencia de anillos en las colonias (RAMOS, 2016).

3.5.8.2. Caracterización microscópica

La identificación microscópica se visualizó de las estructuras reproductivas a través de microscopía óptica. Para lo cual se siguió la técnica de la cinta adhesiva reportado. (Hernández, 2018). Brevemente, la técnica consiste en tocar levemente la colonia en desarrollo con la cinta adhesiva la misma que se la pega en el portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. Las estructuras de los hongos fueron observadas a 40x y para su identificación se utilizó el Atlas “Illustrated Genera of Imperfect Fungi” (Baenett y Hunter, 1998).

Finalmente, para tener un registro de la identificación morfológica se tomaron fotografías de las colonias, de los hongos que presentaron estructuras para la identificación y de los aislados que presentaron sólo micelio en el medio de cultivo APD.

3.5.9. Identificación o caracterización molecular

3.5.9.1. Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó a partir del cultivo puro en medio PDA. Una pequeña porción de micelio fúngico fue extraída de todos los micelios obtenidos y colocados en microtubos 1,5 ml (Eppendorf), se extrajo el ADN usando el Plant PureLink kit extration (Invitrogen) (Ilustración 09-3), siguiendo un protocolo según las instrucciones del fabricante. La elección de este kit de extracción se realizó basándose en los buenos resultados obtenidos ya que garantiza una lisis celular eficiente, el ADN extraído se conservó a -20°C, para luego ser amplificado mediante la técnica de PCR.



Ilustración 9-3: Kit Plant PureLink kit extraction

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

3.5.9.2. Amplificación de la región ITS

Las reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la amplificación de los genes taxonómicos del espacio transcrito interno, ITS (Internal Transcribed Spacers), ITS1-5.8S-ITS2, por sus siglas en inglés) del ADN ribosomal, utilizando los “primers” o cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para obtener un producto de aproximadamente 500 a 700 pb descrito por (White, y otros, 1990), se realizaron en un volumen de reacción de 25 μ L. Cada muestra contenía 12 μ L de Master Mix. DreamTaq Green (Thermo Scientific™), 1 μ L de cebador ITS1, 1 μ L de cebador ITS4 (cada primer contenía una concentración de 10 pmol), 10 μ L de agua libre de nucleasas ultra pura y 1 μ L de ADN.

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 53°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 1:30 segundos seguido de una extensión final a 72°C por 5 minutos (Ilustración 10-3).

La visualización de los productos de la PCR se realizó en gel de agarosa (2%), para lo cual se pesó 6 gramos de agar y se lo cubrió totalmente con la solución buffer TBE 1X y suplementado con bromuro de etidio (10 mg/L). En cada corrida de las muestras se utilizó un 1 μ L de *Ladder* o escalera (100-2000 pb) ubicado en el primer pocillo del gel. Los amplicones se corrieron a un promedio de 90 voltios por una hora (Ilustración 11-3), seguidamente se fotodocumentó en el transluminador UV (LABNET) (Ilustración 12-3) (Ilustración 1-3).



Ilustración 10-3: PCR

Realizado por: Chancusig, A., 2023.



Ilustración 11-3: Corrida electroforética

Realizado por: Chancusig, A., 2023.



Ilustración 122-3: Transluminador UV

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

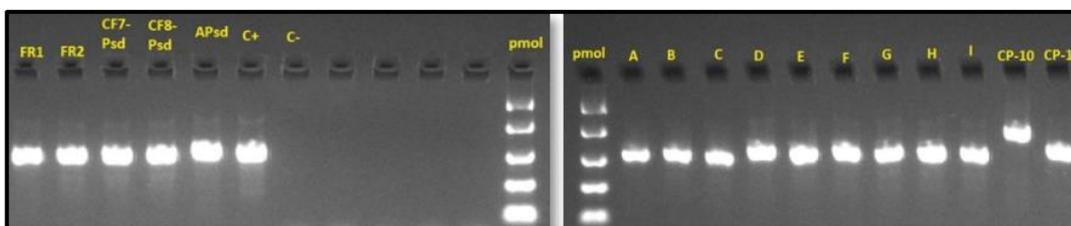


Ilustración 3-3: Visualización y foto documentación de las bandas de ADN

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

3.5.9.3. Purificación y secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR, amplicones, fueron enviadas a la empresa MACROGEN en Seúl-Corea, donde fueron purificados y secuenciados.

Para la edición y limpieza de las secuencias se alinearon a dos secuencias “forward” y “reverse” para obtener una secuencia consenso para lo cual se utilizó el programa Clustal W implementado en Mega versión 11.0 (Tamura K., 2021).



Ilustración 14-3: Alineamiento de secuenciación para obtener una secuencia consenso

Fuente: (Tamura et al., 2021, p.11).

3.5.9.4. Análisis filogenético

Para el análisis de las relaciones filogenéticas de las especies de hongos microscópicos encontrados, utilizando el método “Maximum Likelihood” utilizando el programa Mega versión 11.0 (Tamura K., 2021). Para evaluar el soporte estadístico de las ramas se utilizó el método “Bootstrap” con 1.000 repeticiones. Como grupo externo se usó a *Tetraselmis marina* con el número de acceso KY655020.1

Cada una de las secuencias editadas fue sometida a un análisis BLAST, esta herramienta permitió encontrar regiones de similitud entre secuencias de nucleótidos de los aislamientos con secuencias de las bases de datos, calculando la significancia estadística de las coincidencias. La búsqueda usando BLAST está disponible en Internet a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización macroscópica y microscópica

Se procesaron un total de 217 muestras de hojas y pseudotallos afectadas de cultivos de banano, para una identificación más precisa de nuestros aislamientos del total de las 31 fincas se hizo una preselección y selección final, como resultado final se obtuvieron 16 aislamientos de hongos de los 8 sectores, El Carmen, El Occidente, El cascajo, Santa Rosa, Bellavista, El Camote, Tomás de Berlanga y Salasaca.

Al realizar la identificación morfológica se logró identificar 8 hongos que pertenecen a dos géneros detallados en la tabla 1-4:

Tabla 1-4: Resultados de la identificación morfológica de los hongos analizados

No.	CÓDIGO	TEJIDO	MORFOLOGÍA
1	B-02ABG	Hojas de banano	<i>Collectotrichum sp.</i>
2	E-05ABG	Hojas de banano	<i>Collectotrichum sp.</i>
3	F-09ABG	Hojas de banano	<i>Collectotrichum sp.</i>
4	I-09ABG	Hojas de banano	<i>Collectotrichum sp.</i>
5	G-07ABG	Hojas de banano	<i>Collectotrichum sp.</i>
6	H-08ABG	Hojas de banano	<i>Collectotrichum sp.</i>
7	CF8Psd-14ABG	Pseudotallo de banano	<i>Fusarium sp.</i>
8	CF7Psd-15ABG	Pseudotallo de banano	<i>Fusarium sp.</i>

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

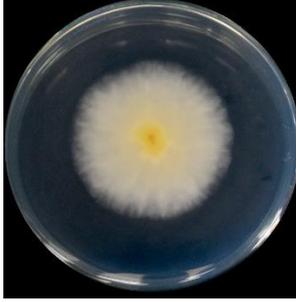
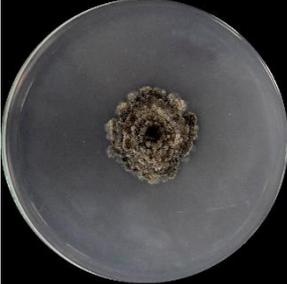
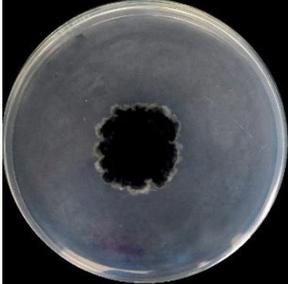
El análisis que identifican los caracteres macro y microscópicas se realizó con base en el concepto de morfoespecie. La actual investigación identificó ocho hongos fitopatógenos. Sin embargo, es indispensable mencionar que no se encontró estructuras específicas vitales del restante de las 16 muestras aisladas, lo que, impidió la identificación de los mismos. Esto puede suceder por la falta de esporulación en los medios de cultivos, otra causa manifiesta que este tipo de hongos endófitos provienen de un proceso extenso de coevolución con sus albergadores vegetales, lo que dificulta su aislamiento y si se consigue aislar no logran ser fértiles “*in vitro*” o necesita un mayor tiempo para la esporulación, algunos hongos necesitan entre dos a catorce meses luego de la inoculación (Ramírez, et al., 2006). No obstante, en el proceso de inoculación pudo existir alguna contaminación del ambiente que provocó el mal desarrollo del hongo.

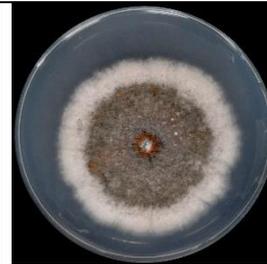
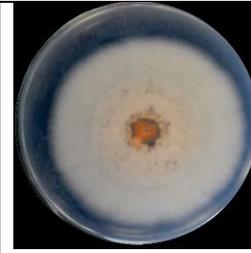
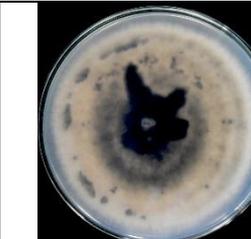
4.1.1. Características macroscópicas

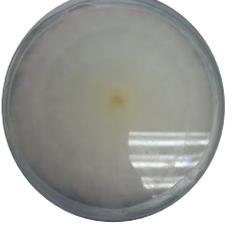
Considerando las características de los sitios de estudio, se comprobó que la mayor parte de los aislamientos obtenidos e identificados en los sitios de estudio, son especies del género *Collectotrichum sp.*, abarcando 6 de 16 aislamientos. Al inicio, la sintomatología se presenta con lesiones las cuales con el paso del tiempo y evolución de la enfermedad causan una necrosis total de las hojas. La enfermedad propagada por este hongo es conocida comúnmente como antracnosis o infección latente, posee una habilidad natural para infectar a raíz, tallo, hojas, flores y fruto (Beltrán & García, 2006). *Collectotrichum* presenta distintos morfotipos, como por ejemplo margen circular, entero, coloración de micelio gris, con masas conidiales anaranjadas. La tabla 2-4 describe todas las características morfológicas de las especies estudiadas:

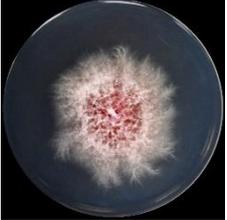
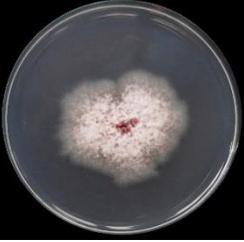
Tabla 2-4: Características macroscópicas de los hongos estudiados

Código	Anverso	Reverso	Imagen referente de la revisión bibliográfica
A-01ABG <i>Xylaria sp.</i>			
<p>Colonias en agar PDA a 28°C alcanzan un diámetro de hasta 3,5 - 4 cm en 10 días, micelio algodonoso, exuberante de un color blanco, en la parte anversa y color crema un poco amarillo al reverso de la caja, borde regular, colonia semicircular, textura granular. Todo el tiempo se mantuvo del mismo color de inicio, tiende a llenar la caja p. bordes filamentosos en todo su interior. Este resultado es similar a la investigación de Carbajal (2017) en el que se presenta una colonia blanca, el estroma cilíndrico claviforme, con un estípite pequeño, que se origina en una base bulbosa, superficie rugosa, ápices estériles, ostiolos finamente papilados que le confieren un aspecto casi equinulado con diámetro de 4,15cm en 14 días.</p>			
B-02ABG <i>Collectotrichum sp.</i>			
<p>Colonia de agar a 28°C alcanza un diámetro de hasta 2,5 – 3cm, superficie densamente aterciopelada en el centro verde claro amarillo, micelio joven blanco con el borde verde clarito, con el tiempo verde pálido en todo el micelio, en la parte reversa verde oscuro negro con puntos en forma de pecas por todo el micelio. Tiende a llenar las cajas Petri. Estos resultados son similares al estudio de Valdés et al., (2017) en el que obtuvieron un crecimiento fue</p>			

<p>siempre circular y con bordes irregulares. Las coloraciones de las colonias varían entre el blanco, gris verdoso y gris pálido.</p>			
<p>C-03ABG <i>Fusarium oxysporum</i></p>			
<p>Crecimiento de la colonia relativamente lento en 7 días 2 cm aproximadamente, 15 días a más 4 – 4,5 cm, superficie de la colonia circular de color blanco purpuro, textura algodonosa aterciopelada, superficie un poco elevada en el centro y va disminuyendo hacia los bordes poco a poco. Reverso de la caja color blanco hueso con bordes filamentosos, tiende a llenar la caja Petri. Los resultados son similares a la investigación de Acevedo (2021) donde los cultivos puros produjeron un crecimiento micelial flocosa y abundante crecimiento aéreo y colonia inversa de color vinaceo a vinaceo oscuro (reverso). En los cultivos puros desde 10 a 14 días, se observaron estructuras reproductivas, Las microcondias fueron hialinas, unicelulares, ovales a elipsoides de 4,5 a 10,9 μm de longitud x 2,2 a 3,3 μm de ancho. Los macrocondias fueron hialinas, fusiforme, con células basales del pie en forma puntiaguda y apicales ahusadas, de 2 a 5 septas de 28,6 a 47,6 μm de longitud x 2,2 a 3,6 μm de ancho (p.24). a pesar de la diferencia de colores, la forma de crecimiento es similar al resultado obtenido.</p>			
<p>D-04ABG <i>Guignardia sp.</i></p>			
<p>Crecimiento de la colonia lento, alcanza un diámetro de aproximadamente 1,3 – 1,5 cm en 7 días, colonia de forma irregular circular de color plomo oscuro, textura granular rugosa, reverso café oscuro/negruzca, a los 28 días mantuvo el color y textura de principio/ diámetro alcanzado de 2,4 cm. este resultado es similar al del estudio De Mesa et al., (2020), donde las características son similares en color y forma.</p>			
<p>E-05ABG <i>Collectotrichum siamense</i></p>			
<p>Colonia circular color crema, en el centro plomo blanquecino, diámetro de 2 – 2,5cm en 7 días, crecimiento rápido, textura lanosa, vellosa, superficie elevada del centro hacia los bordes, reverso de la caja color blanco hueso con bordes filamentosos, en el centro con un color crema con puntos negros irregulares en forma de pecas. A los 15 días cambia de color en el centro a plomo oscuro tonalidad baja, anverso de la caja. Este resultado es similar a la investigación de Lopes (2021) en plantas de guaraná.</p>			

<p>F-06ABG <i>Collectotrichu</i> <i>m boninense</i></p>	 <p style="text-align: center;">F</p>	 <p style="text-align: center;">F</p>	
<p>Los resultados de la presente investigación presentan una gran similitud con la investigación de Oliul et al (2018), en el que describen morfológicamente a la especie <i>Collectotrichum boninense</i> con una colonia circular de color blanco con un anillo irregular de color café claro, crecimiento rápido, textura esponjosa, al reverso café claro a beige con un anillo en el centro color café oscuro, diámetro alcanzado 2cm a los 7 días, 15 días 3. 3,2 cm.</p>			
<p>G-07ABG <i>Collectotrichu</i> <i>m sp.</i></p>			
<p>El presente resultado contiene concordancia con el estudio de Song et al., (2012) realizado en pimiento rojo en el cual indicaron que la colonia crece de manera circular con anillos blancos-crema en el borde, café claro en el centro-poco anaranjado, textura polvorienta con exudados de color anaranjado. Reverso blanco crema con anillos color café oscuro en el centro con estrías y borde blanco. Sin embargo la incubación del actual estudio fue de 15 días en comparación a la de la bibliografía revisada de 7 días, esto puede ser justificativo en la intensidad de color de las muestras.</p>			
<p>H-08ABG <i>Collectotrichu</i> <i>m sp.</i></p>			
<p>La presente muestra presenta características similares a la G-07ABG y a Song et al., en su colonia circular de color blanco crema, textura polvorienta, anillos al centro con puntos gris y centro anaranjado, reverso blanco con crema con anillos de color café oscuro y el centro anaranjado-tomate con puntos en forma de pecas o gránulos café. Diámetro alcanzado de 2,5 – 3cm a los 8-10 días, por lo que su intensidad de color varía un poco.</p>			
<p>I-09ABG <i>Collectotrichu</i> <i>m siamense</i></p>		 <p style="text-align: right;">I</p>	
<p>Colonia circular de color café blanquecino con borde irregular-filamentoso, textura algodonosa, reverso color crema anillos color café oscuro, en el centro un pequeño anillo oscuro y puntos pequeños e irregulares en toda la caja, superficie un poco elevada, tiende a llenar toda la caja petri, crecimiento rápido.</p>			

<p>CP-10ABG <i>Hypoxylon polyporus</i></p>			
<p>Colonia circular color gris-blanquecino con un anillo en el centro de color amarillo pálido, textura con formación de exudados de color café oscuro, con el tiempo se torna de color amarillento verdoso. Reverso gris pálido con un anillo al centro de color amarillo, a los 15 días en adelante se vuelve color negro todo el medio PDA. Llena toda la caja petri.</p>			
<p>CP-11ABG <i>Fungal endophyte sp.</i></p>			
<p>Colonia circular de color blanco, elevada en los bordes, textura lanosa, con bordes filamentosos, reverso amarillo con bordes de color crema y con estrías en su interior. Tiende a llenar por completo la caja petri.</p>			
<p>FR1-12ABG <i>Epicocum sorghinum</i></p>			
<p>Las siguientes características: colonia circular de color café clarito, textura algodonosa, ligeramente elevada en los bordes, en el centro de color café, diámetro de 2 cm en 7 días y en 15 días 3cm, crecimiento ligeramente rápido. Reverso color crema café con anillos irregulares en los bordes de color café claro y en el centro café oscuro, son similares a la investigación de Taguiam et al., (2019) en el que mencionan que el hongo aislado del tallo de la pitahaya enferma mostró micelio blanco a grisáceo con un crecimiento radial promedio de 24 mm y 42 mm a los 3 y 7 días de la incubación, respectivamente. Pálidoconidios marrones y globosos, midiendo en promedio 11.53 μm (30 conidios, que van desde 6,18 a 17,00 μm), se observaron desde el cultivo de 7 días. El hongo exhibió un color marrón rojizo pigmentación en el medio PDA a los 7 días postincubación que estaba claro en la parte inferior de la placa de Petri (p.4).</p>			
<p>FR2-13ABG <i>Fusarium equiseti</i></p>			
<p>Las características morfológicas detectadas en el presente estudio son similares a la investigación de Ávila et al., (2019) en el que comparten una colonia irregular, algodonosa de color combinado con café claro y marrón, ligeramente elevado, diámetro alcanzado 2,1 cm a los 7 días, reverso café intenso.</p>			

<p>CF7Psd-14ABG <i>Fusarium oxysporum</i></p>			
<p>Colonia circular. Coloración blanca a crema pálida, ocasionalmente ha rosa violeta, crecimiento lento y superficial sin elevación, reverso de rosado pálido con filamentos alargados en forma de plumas.</p>			
<p>CF8Psd-15ABG <i>Fusarium oxysporum</i></p>			
<p>Al igual que la muestra CF7Psd-14ABG se visualizó una colonia circular con coloración blanca a crema pálida, ocasionalmente a rosado violeta, crecimiento lento y superficial sin elevación, reverso color blanco hueso con bordes irregulares. Dentro de las características morfológicas se encontró relación con la investigación de Hussain et al., (2012) en la cual mencionan características en clamidosporas en medios de cultivo de guayaba siendo gruesas amurallada, terminal o intercalada, globosa, lisa o rugosa, generalmente unicelular (6.25 - 9.25 μm) producido en hifas y conidios. También se encontraron clamidosporas en dos celdas o en racimo (10,0 - 30,0/7,5 μm) y en forma de cadena (17,5 - 30,0/7,5 μm).</p> <p>Los caracteres morfológicos antes mencionados se consideraron como criterios secundarios para la identificación de <i>F. oxysporum</i>, la forma de las macroconidias producidas es una de las principales características definitorias de <i>Fusarium spp.</i>, y son preferidos en propósito de identificación, además se informó sobre el patógeno causante del marchitamiento <i>F. oxysporum</i> que existe en una variedad de formas clonales que difieren en patogenicidad, morfología y cultura de los caracteres (p.51-52).</p>			
<p>APsd-16ABG <i>Xylaria multiplex</i></p>			
<p>Este resultado es similar a la muestra A-01ABG y a la investigación de Carbajal (2017) en el que se presenta una colonia blanca, el estroma cilíndrico claviforme, con un estípote pequeño, que se origina en una base bulbosa, superficie rugosa, ápices estériles, ostiolo finamente papilados que le confieren un aspecto casi equinulado con diámetro de 4,15cm en 14 días.</p>			

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

Tabla 3-4: Caracterización macroscópica de las colonias obtenidas en agar PDA a 25°C

Código de cepa	Forma	Borde	Superficie	Color anverso	Color reverso	Textura	Crecimiento	Incubación(d)	Diámetro(cm)
A-01ABG	Irregular	Filamentosos	estriada	blanco	Crema	Algodonosa	Rápido	10	3,5-4
B-02ABG	Circular	Regular	densamente aterciopelada	Verde grisáceo en el centro	Verde oscuro	Algodonosa	Lento	7	2,5-3
C-03ABG	Circular irregular	Filamentosos	Poco elevada	Blanco	Blanco amarillento	Algodonosa	Lento	7	2
D-04ABG	Irregular	Irregular	Plana	Grisáceo	Grisáceo oscuro	Granular rugosa	Lento	10	1,5-2
E-05ABG	Circular	Filamentoso	Elevada	Blanco-crema	Café beige	Algodonoso grueso	Rápido	7	4
F-06ABG	Circular	Con anillos	Elevada	Café claro	Café oscuro	Espanjosa	Lento	15	2,5-3
G-07ABG	Semicircular	Con anillos	Poco elevada	Café	Café oscuro	Polvorienta con exudados	Lento	15	3
H-08ABG	Circular	Con anillos	Poco elevada	Gris anaranjado	Gris	Polvorienta	Lento	10	3
I-09ABG	Circular	Irregular filamentosos	Poco elevada	Blanco crema	Café oscuro	Algodonosa gruesa	Rápido	8	4
CP-10ABG	Circular	Con anillos	Poco elevada	Gris	Gris amarillento	Exudados	Rápido	7	Lleno
CP-11ABG	Irregular	Irregular filamentosos	Elevada	Blanquecino	Blanquecino grisácea	Algodonosa	Lenta	10	3
Fr1-12ABG	Circular	Anillos irregulares	Ligeramente elevada	Café clarito	Café-crema	Algodonosa	Rápido	8	3
Fr2-13ABG	Irregular	Anillos irregulares	Ligeramente elevada	Café claro	Marrón	Algodonosa	Rápido	8	3
CF7Psd-14ABG	Circular	Filamentosos	Elevada	Blanco tornándose purpura	Rosado violeta	Velloso	Rápido	7	3
CF8Psd-15ABG	Circular	Filamentosos	Elevada	Blanco tornándose purpura	Rosado violeta	Velloso	Rápido	7	3
APsd-16ABG	Irregular	Filamentosos	Estriada	Blanquecino	Amarillento	Algodonosa	Rápido	8	2,5-3

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

4.1.2. Caracterización molecular

Los ensayos de PCR que amplificaron la región ITS, se realizaron utilizando los cebadores ITS1 (F) e ITS4 (R). Los tamaños de la amplificación de las regiones ITS del ADNr de 6 aislamientos, generaron fragmentos con un tamaño de aproximadamente 500-700 pb, para los aislamientos B-02ABG, E-05ABG, F-06ABG, G-07ABG, H-08ABG, I-09ABG, que engloban el género *Collectotrichum*, cuyo tamaño de bandas son similares a los tamaños de amplificación de fragmentos de ITS reportados por Márquez et al. (2013) usando los marcadores moleculares ITS1 e ITS4. Así mismo, en esta investigación se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 800 a 950 pb en el aislamiento CP-10ABG, como se muestra en la Ilustración 1-4, correspondientes al género *Hypoxyylon*, donde se presenta una etapa endófito en su ciclo de vida y produce varios metabolitos secundarios con actividades interesantes que incluyen el inhibidor de la topoisomerasa 1 denominado hipoxielerona (Piettre et al., 2002) y los agentes antiparasitarios conocidos como ácidos nodulispóricos (Bills et al., 2012), entre otros. Los aislamientos C-03ABG, FR2-13ABG, CF7Psd-14ABG, CF8Psd-15ABG se identificó al hongo *Fusarium oxysporum* generando fragmentos con un tamaño aproximado de 600 pb, coincidiendo con lo descrito por Leong et al. (2009, p.7).

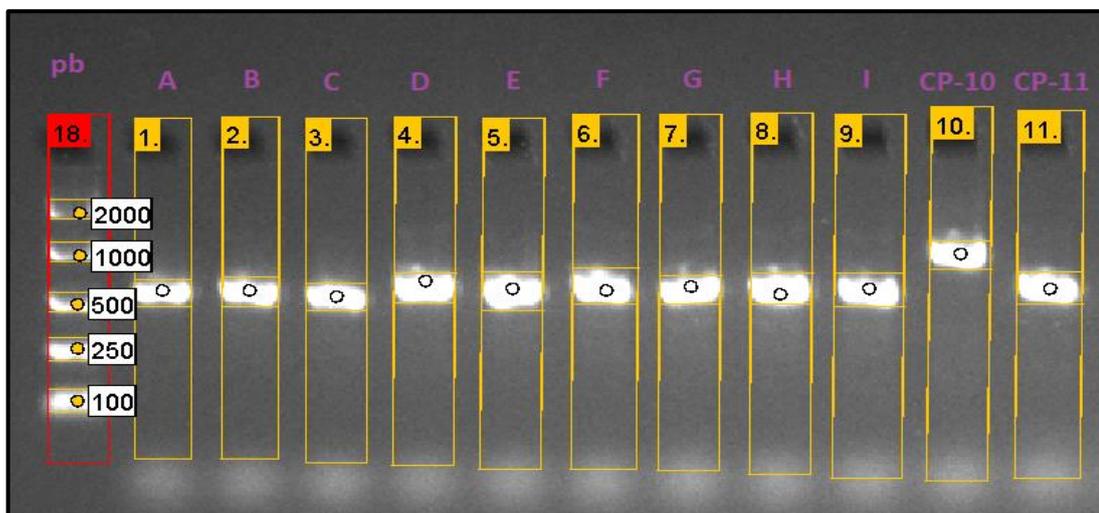


Ilustración 1-4: Productos de PCR sobre gel de agarosa al 2 % obtenidos a partir de los amplicones de la región ITS. La primera y última fila representa al marcador de peso molecular de EasyLadder™ I. de 200 lanes

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

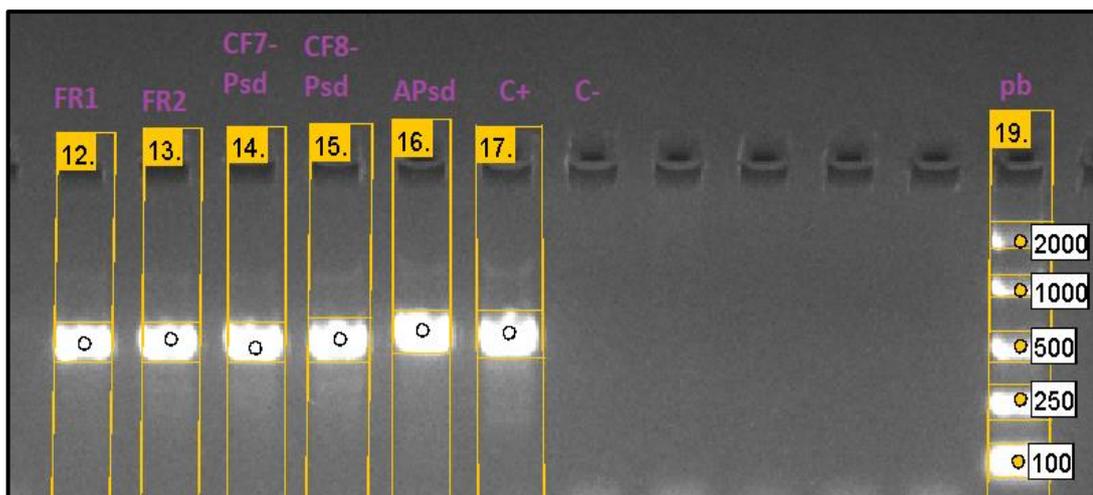


Ilustración 2-4: Productos de PCR sobre gel de agarosa al 2 % obtenidos a partir de los amplicones de la región ITS. La primera y última fila representa al marcador de peso molecular de EasyLadder™ I. de 200 lanes

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

4.1.2.1. Análisis Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*)

Tabla 4-4: Número de accesión y porcentaje de cobertura e identidad de los aislamientos identificados por secuenciación de los marcadores ITS (Espacio transcrito interno)

No.	CÓDIGO	TEJIDO	GENERO Y ESPECIE	COBERTURA E IDENTIDAD (%)	ACCESIÓN EN GENBANK
1	C-03ABG	Hojas de banano	<i>Fusarium oxysporum.</i>	100 100	MT560381.1
2	E-05ABG	Hojas de banano	<i>Collectotrichum siamense.</i>	100 100	MT450691.1
3	I-09ABG	Hojas de banano	<i>Collectotrichum siamense</i>	100 100	MT450691.1
4	CP-10ABG	Hojas de banano	<i>Hypoxyylon polyporus.</i>	100 100	JQ760904.1
5	CP-11ABG	Hojas de banano	<i>Fungal endophyte sp.</i>	100 99	ECU977315.1
6	Fr2-13ABG	Hojas de banano	<i>Fusarium equiseti</i>	100 100	MT558570.1
7	CF7Psd-15ABG	Pseudotallo de banano	<i>Fusarium oxysporum.</i>	100 100	MT560381.1
8	CF8Psd-14ABG	Pseudotallo de banano	<i>Fusarium oxysporum.</i>	100 100	MT560381.1

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

La identificación realizada mediante el análisis Blast, de las regiones ITS de cada aislamiento, indicó que las secuencias de los aislamientos del sector de Santa Rosa E-05ABG y I-09ABG se alinearon con un porcentaje de homología del 100%, en cuanto a identidad y cobertura de consulta con *Collectotrichum siamense*. Asimismo, la muestra Fr2-13ABG tomada de los Pseudotallos presentaron el 100% de similitud con *Fusarium equiseti*. Estos resultados son similares al estudio de Zakaira & Wan en el que identificaron molecularmente 10 géneros que comprenden 17 especies de hongos endófitos de hoja de banano (*Musa spp.*) su identificación al igual que el presente estudio se basó en la mayor similitud de la búsqueda BLAST con porcentajes de similitud de 97% y 100%. Dentro de las cuales se encuentran una especie de *Collectotrichum siamense* que comúnmente es un patógeno en un amplio rango de huéspedes. Asimismo, se encontró el género *Fusarium sp.* el cual es muy común en muchas plantas, especialmente es asociado con plantas de banano, las especies encontradas fueron *Fusarium equiseti* y *Fusarium chlamydosporum*. Los resultados del presente estudio indicaron que varias especies endófitas son patógenos potenciales que se encuentran en una fase latente. Una observación similar también fue reportada por Photita et al. (2004), de los cuales varios hongos endófitos de las hojas de banano silvestre fueron capaces de causar la enfermedad de las manchas foliares. Varios factores que pueden contribuir a que el endófito se vuelva patógeno incluyen el estrés de la planta huésped, cambios en la susceptibilidad del huésped debido a un suministro deficiente de nutrientes y humedad excesiva). Cualquier factor que pueda debilitar la capacidad de la planta hospedante para limitar el crecimiento del endófito fúngico podría permitir que cierto endófito se vuelva patógeno (Zakaira y Wan, 2018, pp.201-211).

Además de ello, con los resultados del análisis Blast, se determinó que la utilización de las secuencias a partir de la región ITS, permite identificar a nivel de especies a *Fusarium oxysporum*, siendo necesario ampliar el estudio posteriormente, utilizando más genes taxonómicos como por ejemplo el gen de la β -tubulina (TUB2), ACT1, gen de la endoquinasa, en especial recurriendo a la secuenciación del gen *tef1* el cual según Infante et al. (2013), es el más confiable ya que proporciona excelentes resoluciones del subtipo y los taxos muy relacionados. Esto permitirá identificar a nivel de especie a aquellos aislamientos aun no identificados debido a sus múltiples homologías. Dentro de las muestras analizadas C-03ABG, CF7Psd-15ABG y CF8Psd-14ABG en las hojas y tallos de banano se generó el 100 % de similitud en el análisis Blast, este resultado concuerda con el estudio de Özarıslandan (2020, p.4) en el Primer Reporte de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Raza 4 que causa la enfermedad del marchitamiento por *Fusarium* del banano en Turquía comparó los productos de PCR secuenciados con la base de datos NCBI GenBank, el análisis NCBI BLAST mostró una identidad del 100 %, (*F. oxysporum f. sp. cubense* cepa VCG 01213) en la base de datos NCBI.

Sin embargo, no se encontró bibliografía relacionada a la *Hypoxylon polyporus* y *Fungal endophyte sp.*, de acuerdo al NCBI BLAST se encontró el 99,09% y 100% de similitud con estas especies respectivamente.

4.1.2.2. Análisis filogenético

Para la construcción de árbol filogenético únicamente se consideraron 8 secuencias, C-03ABG E-05ABG, I-09ABG, CP-10ABG, CP-11ABG, Fr2-13ABG, CF7Psd-15ABG y CF8Psd-14ABG, ya que no se obtuvieron secuencias de todos los aislados y que posiblemente durante el proceso de secuenciación existen algunos errores que impiden que se realice la reacción.

El árbol filogenético fue reconstruido mediante la comparación de las secuencias obtenidas, con las secuencias de referencia de GenBank (Ilustración 3-4), utilizando el método “Maximum Likelihood” previo a un alineamiento múltiple de las respectivas secuencias. La identificación realizada mediante el análisis BLAST-N del NCBI de las regiones ITS de cada aislamiento con el método “Clustal W” reveló que las secuencias presentaron el mayor porcentaje de similitud con los hongos pertenecientes a los géneros *Collectotrichum* y *Fusarium*, confirmando lo encontrado con la identificación morfológica y molecular. Todos los organismos pertenecen al filo Ascomycota y el outgroup a *Chlorophyta*. Las cifras que se encuentran en las ramas pertenecen al porcentaje de soporte del valor de *Bootstrap*.

Se mostraron un 100% de identidad con secuencias de los hongos *Fusarium oxysporum* (número de accesoión del GenBank MT560381.1), *Fusarium equiseti* (número de accesoión del GenBank MT5558570.1) y *Collectotrichum siamense* (número de accesoión del GenBank MT450691.1). Por último, los aislamientos que llegaron a un porcentaje de similitud acertada con un 98% fue *Hypoxylon polyporus* (número de accesoión del GenBank JQ760904.1) y un 94% *Fungal endophyte* (número de accesoión del GenBank EU977315.1).

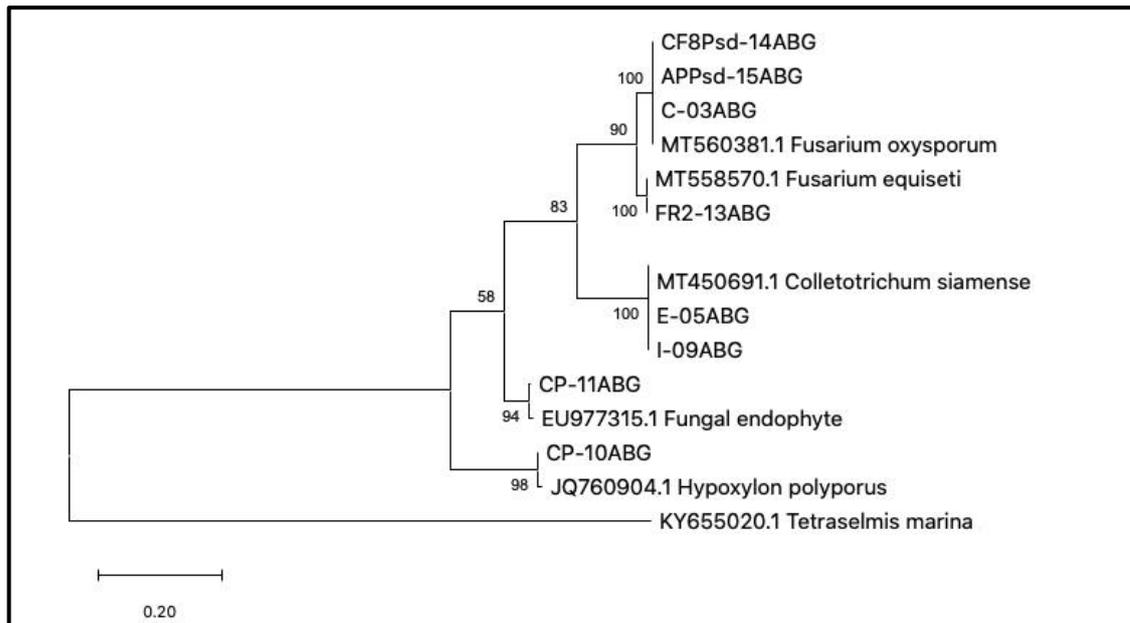


Ilustración 3-4: Árbol filogenético derivado de la región transcrita interna (ITS), utilizando el algoritmo “Maximun Likelihood”. Los codones estuvieron basados en el alineamiento CLUSTALW del programa MEGA 11. Los valores de bootstrap ($\geq 70\%$) están mostrados frente a cada rama del árbol

Realizado por: Chancusig, A., 2023.

De acuerdo a Reyes (2019, pp. 9597), en su estudio Taxonomía y filogenia del género *Hypoxylon* Bull. (Xylariales, Ascomycota) en el bosque tropical caducifolio de Áreas Naturales Protegidas en México, los análisis filogenéticos anteriores relacionan a un grupo monofilético en los Xylariales, y los locus DNAr en la región ITS permiten relacionar el ancestro descendiente del género, es así que, la investigación arrojó un valor Bootstrap mayor o igual que 50% en el cual la especie *Hypoxylon polyporus*, es un clado no resuelto con el 49% sin congruencia morfológica y bajo soporte estadístico. Sin embargo, en la presente investigación el NCBI BLAST valoró con el 98% de similitud con esta especie, respecto a la parte morfológica concuerda con la especie *Hypoxylon* sp, señaló que tiene un estroma efuso pulvinado y pigmentos sepia- grisáceos, similar a la muestra CP-10ABG.

Asimismo, se encontró que la especie *Collectotrichum siamense* tiene el 100% de similitud, estos resultados son similares a Quadros et al., (2015, p.4), en el que se amplificaron fragmentos de ADN de aproximadamente 450 pb para el par de cebadores ITS4/ITS5 y 400 pb para el par de cebadores BT1A/BT2B. Las secuencias obtenidas del aislado se compararon con accesiones del género *Collectotrichum*, disponible en GenBank, en el análisis filogenético, se observó el árbol cuando se utiliza el método Neighbor-Joining, a través de un análisis de bootstrap realizado con 2000 repeticiones, que el aislado formó un clado con las accesiones de la especie *Collectotrichum*

siamense. En Brasil, este hongo fue reportado como causante de enfermedades en árboles frutales, además, la especie *C. siamense* se asocia frecuentemente con árboles de aguacate en Brasil, y representa la especie genéticamente más variable y menos específica en relación con el huésped en las plantas estudiadas. El hongo *Colletotrichum siamense* pertenece al Reino *Fungi*, *Phylum Ascomycota*, Clase *Ascomycetes*, Orden *Phyllacholales*, Familia *Glomerellaceae*, Género *Glomerella* (*Colletotrichum*).

Para las especies *Fusarium oxysporum* y *F. equiseti* se encontró un 100 % de similitud en su análisis filogenético, en comparación a la investigación de Medina (2016, p. 95) análisis de secuencias identificó que los aislamientos asociados a la marchitez vascular del garbanzo en la región del Bajío, México de plantas con síntomas de amarillamiento y marchitez, están coligados a complejos de especies de *Fusarium oxysporum* y *F. equiseti*, por lo que, las especies *Fusarium* son altamente diversas y filogenéticamente distintas, sin embargo, pueden generar síntomas de enfermedad similares entre las plantas huésped. Los síntomas que se generan en el garbanzo son similares a los hallados en los pseudotallos de banano.

El árbol filogenético muestra el 94% de similitud con la especie *Fungal endophyte*, sin embargo, no se encontró información bibliográfica de esta especie.

CONCLUSIONES

- Se identificó morfológica y molecularmente los hongos fitopatógenos en cultivos de banano de la isla Santa Cruz de las que se destacó las especies *Fusarium oxysporum*, *Collectotrichum siamense*, *Hypoxyton polyporus*, *Fungal endophyte sp*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum*.
- Se realizó un muestreo intencional en el que se procesó un total de 217 muestras de hojas y pseudotallos afectadas de cultivos de banano en 31 fincas en ocho sectores de la isla Santa Cruz, del total se realizó una preselección, en el que se generó 16 aislamientos de hongos fitopatógenos.
- Se aisló los hongos fitopatógenos en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (APD) previo a un tratamiento de desinfección de las muestras obteniendo aislamientos puros evidenciándose luego de los 5 días de incubación a 25 °C el crecimiento de las diferentes especies.
- Se describió morfológicamente los hongos fitopatógenos aislados del cultivo de banano especialmente, del total estudiado seis especies presentaron características morfológicas como color, forma del borde, textura, elevación, y presencia de anillos en las colonias similares a las especies del género *Collectotrichum sp.*, siendo responsable de la necrosis de las hojas del banano, enfermedad conocida como antracnosis o infección latente, y puede darse naturalmente en la raíz, tallo, hojas, flores y fruto. Existe variedad dentro los morfotipos pueden ser de margen circular, entero, coloración de micelio gris, con masas conidiales anaranjadas, por lo que, se concluye que una gran cantidad de plantas de banano en las fincas de la isla Santa Cruz poseen la enfermedad antracnosis.
- Se identificó molecularmente los aislamientos de hongos fitopatógenos mediante el aislamiento del ADN con Kit Plant PureLink kit extraction (Invitrogen), una amplificación con Master Mix DreamTaq Green (Thermo Scientific™) y cebadores (ITS1-ITS4), se procedió a la purificación de los productos de PCR, se realizó la secuenciación, se editó las secuencias y se determinó su identidad, en consecuencia se obtuvo que de las 16 muestras tomadas 8 obtuvieron similitud de las regiones ITS de cada aislamiento en el NCI BLAST, una especie importante es el *Colletotrichum siamense* que comúnmente es un patógeno en un amplio rango de huéspedes y es el causante de la enfermedad antracnosis, por lo que se verificó la presencia de esta especie. Se comparó las secuencias obtenidas del aislado con accesiones del género *Colletotrichum*, disponible en GenBank y presentó el 100% de similitud en su análisis filogenético.

RECOMENDACIONES

- Con los resultados obtenidos de los aislados del banano podrían realizarse nuevas investigaciones para determinar si realmente el género *Fusarium* podría ser utilizado como control biológico de plagas, ya que actualmente en nuestro país se están utilizando químicos para el control de enfermedades, que resultan en daños para el hombre y para el ecosistema.
- Se sugiere hermetizar las muestras para enviar a secuenciar con el fin de evitar contaminaciones en las muestras, que puedan causar ruidos en la lectura del equipo y dificulte la identificación de la especie.
- Se recomienda estudiar otras islas de Galápagos para dimensionar la propagación de las distintas enfermedades y así generar un plan de acción frente a esta problemática
- Es importante extender el estudio para aquellas especies que no lograron esporular, con el propósito de extender la identificación de las especies que infectan las plantas de banano en la isla Santa Cruz.

BIBLIOGRAFÍA

ABEDRABBO A. Identificación microscópica y molecular de hongos asociados a *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka Negra) en banano 2012 [En línea]. (Trabajo de Titulación) (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito. Quito-Ecuador. 2017. p.11. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6666/1/131972.pdf>

ACEVEDO GONZÁLEZ, Camila Fernanda. Identificación de *Fusarium oxysporum* causando la amarillez y declinación del poroto (*Phaseolus vulgaris*) en la Región del Maule [En línea]. (Trabajo de Titulación) (Tesis de postgrado). Universidad de Talca. Chile. 2021. [Consulta: 18 febrero de 2023]. Disponible en: <http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/12547/3/2021A000279.pdf>

AGRIOS, G. *Fitopatología*. 4 ed. México: Limusa, 1996, p. 838.

AGRIOS, N. *Plant Pathology*. 5 ed. USA: Elsevier Academic Press, 2005, pp. 1-922.

AGUIN, A.; et al. *Técnica de Diagnóstico en Fitopatología Forestal*. 1 ed., 2009. p. 45.

ÁVILA, C.; et al. “*Fusarium incarnatum-equiseti* species complex associated with Brazilian rice: Phylogeny, morphology and toxigenic potential”. *International Journal of Food Microbiology* [En línea], 2019, 36(1). p.108267. [Consulta: 11 diciembre 2022]. Disponible en: [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108267](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108267)

AVILÉS M.; & GRANJA G. Identificación morfológica y molecular de hongos microscópicos obtenidos en cultivos comerciales enfermos, en la región interandina centro- norte del Ecuador en el período 2011-2012 [En línea]. (Trabajo de Titulación) (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Católica Del Ecuador. Quito – Ecuador. 2014. p. 17. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8763/PONTIFICIA%20UNIVERSIDAD%20CATÓLICA%20DEL%20ECUADO1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

BAAYEN, R.; et al. “Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta*

capitalensis)". *Phytopathology*® [En línea]. 2002, 92(5), pp. 464-477. [Consulta: 18 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PHYTO.2002.92.5.464>

BANDAR, Fahad Almiman. "Identifying phytopathogenic fungi in Albaha province, Saudi Arabia through their molecular and morphological features". *Saudi Journal of Biological Sciences* [En línea], 2023, 30(3), p. 103572, ISSN 1319-562X. [Consulta: 11 diciembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103572>

BATALLAS E. Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca L.*) Sector los laureles, cantón La Maná, Cotopaxi 2015 [En línea]. (Trabajo de Titulación) (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Cotopaxi. Cotopaxi -Ecuador. 2015. pp.7-16. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2512/1/T-UTC-00047.pdf>

BORJA. N. El deshoje fitosanitario como alternativa para reducir la incidencia y severidad de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis Morelet*) en banano [En línea]. (Trabajo de titulación) (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agrarias. Los Ríos - Ecuador. 2019. p. 16. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/6020/E-UTB-FACIAG-ING%20AGRON-000134.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

BRUSTEIN, J. *Back to Basics: Sanger sequencing and its applications*. 2017. [Consulta: 30 mayo 2022]. Disponible en: <https://www.mlo-online.com/home/article/13009097/back-to-basics-sanger-sequencing-and-its-applications>

BRUSTEIN, J. *PCR: the basics of the polymerase chain reaction*. 2013. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <https://www.mlo-online.com/home/article/13005202/pcr-the-basics-of-the-polymerase-chain-reaction>

CAJAL, A. *Los 10 Productos de las Islas Galápagos Más Destacados*. Lifeder. 2017. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/productos-islas-galapagos/>

CARBAJAL ALARCÓN, Frank Shamir. Identificación de hongos endófitos y su uso en la bioprotección de plántulas de café para reducir el daño de *Colletotrichum coffeanum* en San Martín – Perú. [En línea]. (Trabajo de Titulación) (Tesis de postgrado). Universidad Nacional De

San Martín-Tarapoto. Perú. 2017. pp.3-75. [Consulta: 18 de febrero de 2023]. Disponible en: https://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/11458/2418/1/TP_AGRO_00662_2017.pdf

CARVALHO, C.; et al. “Evaluation of the diversity of endophytic fungi isolated from the *uncaria tomentosa* plant (willd.) DC”. *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological* [En línea]. 2021, 8(2). [Consulta: 18 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/3329/3112>

COLD SPRING CENTER HARBOR LABORATORY DENA LEARNIG. “Using DNA Barcodes to Identify and Classify Living Things”. *Annals of Botan* [En línea], 2014, 1(1), pp. 1-28. [Consulta: 31 mayo 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031581>

DE MESA, R.; et al. “Antagonistic activities of needle-leaf fungal endophytes against *Fusarium spp*”. *MycoAsia – Journal of modern mycology* [En línea]. 2020, 1(1). pp. 1-10. [Consulta: 18 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://mycoasia.org/wp-content/uploads/2020/10/de-Mesa-et-al-2020-MycoAsia-2020-06.pdf>

DGSV-DCNRF. *Marchitez por Fusarium en musáceas. Fusarium oxysporum f. sp. cubense Raza 4 Tropical, Foc R4T (syn. Fusarium odoratissimum)* [En línea]. Ciudad de México-México: Sader-Senasica, 2021. [Consulta: 31 mayo 2022]. Disponible en: https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/docs/vgtl/foc_r4t/5_Ficha%20Técnica%20FOC%20R4T%20Actualización%20Abril%202021.pdf

DINTER, T.; et al. “Changes in topsoil characteristics with climate and island age in the agricultural zones of the Galápagos”. *Geoderma* [En línea], 2020, 376(1), p. 114534. [Consulta: 17 diciembre 2022]. ISSN 0016-7061. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114534>

EL PRODUCTOR. *Producción nacional de banano.* 2017. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <https://elproductor.com/2017/04/produccion-nacional-de-banano/>

ELAGAMEY, E.; et al. “*Fusarium oxysporum* Isolates Collected from the same Geographical Zone Exhibited Variations in Disease Severity and Diversity in Morphological and Molecular Characters”. *Egyptian Journal of Phytopathology* [En línea], 2020, 48(1), pp.43-57. [Consulta: 18 de enero del 2023]. Disponible en: DOI: 10.21608/ejp.2020.129068.

ELIAS, S. “Galápagos Island Biodiversity”. *Encyclopedia of the World's Biomes* [En línea], 2020, 1(1), pp.198-216. [Consulta: 15 diciembre 2022]. ISBN 9780128160978. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095489124029>

ESTRADA, G.; & RAMÍREZ, M. *Micología General* [En línea]. Manizales: Universidad Católica de Manizales, 2019. [Consulta: 31 mayo 2022]. Disponible en: https://www.ucm.edu.co/wp-content/uploads/2021/03/Micologia_general.pdf

FAO. *Guía para la aplicación de normas fitosanitarias en el sector forestal* [En línea]. Italia-Roma: FAO, 2012. [Consulta: 30 mayo 2022]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/i2080s/I2080S.pdf>

FAO. *Todo sobre los bananos: lo que debería saber acerca de esta fruta tropical*. 2016. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/zhc/detail-events/es/c/447827/>

FREITEZ, J. Desarrollo de un modelo predictivo del brote de la sigatoka negra para las plantaciones de plátano al sur del lago de Maracaibo [En línea]. (Trabajo de titulación) (Tesis de posgrado). Universidad de los Andes. Mérida-México. 2007. p. 22. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/14743/tesis-sigatoka.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

FUERTES, B.; & MALLTASIG, D. Identificación morfológica y molecular de hongos micorrízicos de especies del género *Drácula* y *Epidendrum* (orchidaceae) [En línea]. (Trabajo de titulación) (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana. Quito- Ecuador. 2022. p. 16. [Consulta: 31 mayo 2022]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15158/1/UPS-QT05355.pdf>

GANAN, L.; et al. “Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol”. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fis. Net.* [En línea]. 2015, 39(152). pp.339-347. [Consulta: 18 de febrero de 2023], Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-39082015000300005&lng=en&nrm=iso

GARIBYAN, L.; & AVASHIA, N. “Polymerase Chain Reaction”. *Journal of Investigative Dermatology* [En línea], 2013, 3(133), pp. 1-3. [Consulta: 31 mayo 2022]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15158/1/UPS-QT05355.pdf>

GRACÍA-BASTIDAS, F.; et al. *Fusarium Raza 4 Tropical (R4T)* [En línea]. Lima-Perú: Comunidad Andina, 2020. [Consulta: 1 junio 2022]. Disponible en: <https://www.comunidadandina.org/StaticFiles/202072181721Guia%20Andina%20Final.pdf>

GUEVARA, G. “Estudio del its nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México” *CIENCIA UANL* [En línea], 2004, (México) 7(3), pp.371-378. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: http://eprints.uanl.mx/1459/1/art_hongos.pdf

HUSSAIN, M. Z.; et al. “Morphological and Molecular Identification of *Fusarium oxysporum* Sch”. *Isolated From Guava Wilt in Bangladesh. Bangladesh Journal of Botany* [En línea], 2012, 41(1), pp. 49–54. [Consulta: 18 de febrero de 2023]. Disponible: <https://www.banglajol.info/index.php/BJB/article/view/11082>

INIAP. *Banano plátano y otras musáceas*. 2010. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <http://www.iniap.gob.ec/web/banano-platano-y-otras-musaceas/>

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL PERÚ. *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN* [En línea]. Perú: Serie de Normas Técnicas No 38, 2003. [Consulta: 31 mayo 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1024/0301-1526.32.1.54>

KORABECNA, M. “The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology”. *Charles University* [En línea], 2007, (Austria) 1(1), pp. 783-787. [Consulta: 31 mayo 2022]. Disponible en: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.628.3446&rep=rep1&type=pdf>

LEE, P. “Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments”. *University of California Los Angeles* [En línea], 2012, (52), p.1. [Consulta: 31 mayo 2022]. Disponible en: <https://doi.org/doi:10.3791/3923>

LEÓN, L. “Ecuador: Producción de banano, café y cacao por zonas y su impacto económico 2013-2016”. *UISRAEL* [En línea], 2018, (Ecuador) 1(1), p.5. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <https://revista.uisrael.edu.ec/index.php/rcui/article/view/324/266>

LOPES CASAS, Luana. *Colletotrichum siamense* como estratégia de controle biológico da antracnose em guaranazeiro [En línea]. (Trabajo de Titulación) (Tesis de postgrado). Universidade Do Estado Do Amazonas. Manaus-Brasil. 2021. pp. 7-85. [Consulta: 29 de enero

2023]. Disponible en:
https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/8778/5/Tese_LuanaCasas_BIONORTE.pdf

LÓPEZ, L. *Trichoderma Harzianum*, usos y virtudes. 1 ed. Ecuador: Universidad Agraria del Ecuador, 2012, p. 12.

MARQUES MW; et al. “Botryosphaeria, Neofusicoccum, Neoscytalidium and Pseudofusicoccum species associated with mango in Brazil”. *Fungal Divers* [En línea], 2013, 61(1), pp. 195–208. Disponible en:
<https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/LOOR%20ERAZO%20JONATHAN%20ANGELO.pdf>

MEDINA, C.; & VALADEZ, E. Estrategias para el estudio de *Fusarium oxysporum* presente en el bajío: razas patogénicas, patogenicidad y filogenia [En línea]. (Trabajo de Titulación) (Tesis de postgrado). Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco. 2016. pp. 10-98. [Consulta: 29 de enero 2023]. Disponible en:
<https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/2670c6d7-0570-494e-a092-5c8afc174057/content>

MEDINA, K. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas enfocadas en el Control Biológico de la Sigatoka Amarilla (*Mycosphaerella Musicola Leach et Mulder*) en el cultivo del Plátano Dominic Hartón (*Musa Aab Simmonds*) en la vereda de Cerinza perteneciente al municipio de Vergara, Cundinamarca [En línea]. (Trabajo de titulación) (Tesis de pregrado). Universidad Agraria Distrital Francisco José de Caldas, Facultad de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Bogotá- Colombia. 2019. p. 15. [Consulta: 30 mayo 2022]. Disponible en:
<https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/22152/MedinaMuñozKarenDanitza2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

MUHAMMAD, A.; et al. “Morphological and genetic characterization of *Fusarium oxysporum* and its management using weed extracts in cotton”. *Journal of King Saud University – Science* [En línea], 2021, 33 (2), p.101299. ISSN 1018-3647. [Consulta: 18 de enero del 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101299>.

OLIUL, H.; et al. “Molecular and Morphological Characterization of *Colletotrichum* Species in the *Colletotrichum gloeosporioides* Complex Associated with Persimmon Anthracnose in South Korea”. *APS Publications* [En línea], 2018. 102(5). [Consulta: 18 de febrero del 2023]. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-10-17-1564-RE#pane-pcw-references>

PASICHE, L. Control de hongos asociados a la pudrición de la corona y detección del inóculo primario en frutos de banano orgánico de exportación en Piura [En línea]. (Trabajo de titulación) (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Piura. Piura-Perú. 2018. pp.3-4. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/1293/AGR-PAS-ABA-18.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

PÉREZ- VICENTE; et al. *Prevention and diagnostic of Fusarium Wilt (Panama disease) of banana caused by Fusarium oxysporum f. sp. cubense Tropical Race 4 (TR4)* [En línea]. FAO, 2014. [Consulta: 30 mayo 2022]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-br126e.pdf>

PÉREZ, V. *Mycosphaerella musicola (Leach) (Capnodiales: Mycosphaerellaceae)* [En línea]. México: SENASICA, 2020. [Consulta: 30 mayo 2022]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/472513/Ficha_t_cnica_Mycosphaerella_musicola.pdf

PHOTITA, W. ¿Son algunos endófitos de *Musa acuminata* patógenos latentes?. *Diversidad de hongos* [En línea], 2004; 16, pp. 131–140. [Consulta: 11 diciembre 2022]. Obtenido de: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/46037335/16-4-libre.pdf?1464514304=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAre_some_endophytes_of_Musa_acuminata_la.pdf&Expires=1676489722&Signature=TKacpG6qWuyZitv6wmuL3N-mx8X02Rvma5s0NIDyNocepO-ASh1PUr-smVEnV7wQNb4FeoXA2au~irdc1gfKMigONLkOR6lgyYCxO10tDmvt1egjYPrScJ-kWMR1J2RTyraGjD8Ap82Xi6cxh04B~ZmPUs0sUhrYU8aunGSBivPWVHVQnhH6RR61UBP67h0OAR1nJtrxUuhJaa88Kx7zARjrInYqkdVuUpG8AtIDZkoqraH9qNENBtu644DQIsrTyJu14Q-ri4qLAFEGVw0kITrMdL4w28mYGbdfFdMqzP1PesxMMHR3ofj~-Y62Wxk8gsWf8CehBiyKoNM5fDwQg__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

PHYTOMA. ¿MAL DE PANAMÁ? (*Fusarium oxysporum f. sp. cubense*). 2019. [Consulta: 1 junio 2022]. Disponible en: <https://www.phytoma.com/sanidad-vegetal/avisos-de-plagas/mal-de-panama-fusarium-oxysporum-f-sp-cubense>

PORTILLO, G. *Morfología de los hongos*. 2018. [Consulta: 30 mayo 2022]. Disponible en: https://www.renovablesverdes.com/morfologia-de-los-hongos/#Morfologia_de_los_hongos

QUADROS, A.; et al. Detecção molecular de *Colletotrichum siamense* em mudas de palma de óleo. *Embrapa Amazônia Oriental*, [En línea], 2015, 13(3). p. 38-41. [Consulta: 11 diciembre 2022]. Disponible en:

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1022662/1/Pibic20157.pdf>

RAGUL, S.; et al. “Survey and isolation of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose disease from Southern districts of Tamil Nadu”. *The Pharma Innovation Journal* [En línea], 2021; 10(11). pp. 1190-1194. [Consulta: 18 de febrero del 2023]. **Disponible en:** <https://www.thepharmajournal.com/archives/2021/vol10issue11/PartQ/10-10-430-387.pdf>

RAMOS, M. Efectos de sulfato de cobre pentahidratado para el control de Sigatoka en el cultivo de banano (*musa spp*) [En línea]. (Trabajo de titulación) (Tesis de pregrado). Universidad Agraria Del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrarias. Milagro- Ecuador. 2022. p. 14. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en:

<https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/RAMOS%20PEÑA%20MICHELLE%20PAULETTE.pdf>

RETANA, K.; et al. “Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP.Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica”. *Agron. Costarricense* [En línea], 2018, 42(1). pp.115-126. [Consulta: 18 de febrero de 2023]. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242018000100115&lng=en&nrm=iso

REYES RODRÍGUEZ, Pamela Estefanía. Taxonomía y filogenia del género *Hypoxylon* Bull. (*Xylariales, Ascomycota*) en el bosque tropical caducifolio de Áreas Naturales Protegidas en México [En línea]. (Trabajo de Titulación) (Tesis de postgrado). Instituto Politécnico Nacional, México. 2019. pp. 20-98. [Consulta: 18 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/28278/Reyes%20Rodr%C3%ADguez%20Pamela%20Estefania%202019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

RIVAS, A. Manejo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el cultivo de Banano, alternando fungicidas protectantes con sistémicos en época invernal [En línea]. (Trabajo de titulación) (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Babahoyo- Ecuador. 2017. p. 8. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <https://docplayer.es/90926514-Universidad-tecnica-de-babahoyo.html>

ROCHA, O.; et al. “Caracterización espacial de la sigatoka amarilla del banano e implicaciones en el muestreo”. *Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuaria* [En línea], 2010, (México) 1(1), p.5. [Consulta: 30 mayo 2022]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v44n3/v44n3a9.pdf>

RODRÍGUEZ DEL CASTILLO, Ginsberg. Caracterización morfológica de hongos endófitos asociados a cacao nativo y su capacidad antagónica para el control de *Moniliophthora perniciosa* [En línea]. (Trabajo de Titulación) (Tesis de postgrado). Universidad Nacional De San Martín-Tarapoto. Perú. 2011. pp.1-102. [Consulta: 18 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://tesis.unsm.edu.pe/bitstream/11458/1191/1/ITEM%4011458-446.pdf>

ROMERO, A.; et al. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* [En línea]. México: INNEC, 2014. [Consulta: 31 mayo 2022]. Disponible en: [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcología.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcología.pdf)

SCOTT, A. Elias. “Galápagos Island Biodiversity, Encyclopedia of the World's Biomes”. *Elsevier* [En línea], 2020, 1(1) pp. 198-216, ISBN 9780128160978. [Consulta: 19 diciembre 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.12402-9>

SENASICA. *Fusariosis de las musáceas (Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 Tropical) (Foc R4T)* [En línea]. Ciudad de México-México: Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria, 2019. [Consulta: 30 mayo 2022]. Disponible en: <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Ficha%20Técnica%20Fusariosis%20de%20las%20musáceas.pdf>

SILVA, H.; & ÁVILA, G. “Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado”. *Plant pathology* [En línea], 2011. 60(5), pp. 899-908. [Consulta: 01 diciembre 2022]. Disponible en: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x>

SISTEMA INTEGRADO DE INDICADORES DE LAS GALÁPAGOS (SIIG). *Producción anual de guineo (banano)*. 2014. [Consulta: 30 mayo 2022]. Disponible en: <https://siig.gobiernogalapagos.gob.ec/php/publico/datos/115>

SONG, C.; et al. “Antifungal Activity of Crude Extract Compound from *Rhus verniciflua* Against Anthracnose Fungi (*Collectotrichum* spp.) of Red-Pepper”. *Korean Journal of Environmental Agriculture. The Korean Society of Environmental Agriculture* [En línea], 2012, 31(1), pp. 60–7. [Consulta: 06 diciembre 2022]. Obtenido de: <http://dx.doi.org/10.5338/KJEA.2012.31.1.60>

TAGUIAM, J.; et al. “Pathogenicity of *Epicoccum sorghinum* towards dragon fruits (*Hylocereus* species) and in vitro evaluation of chemicals with antifungal activity”. *Journal of Phytopathology* [En línea]. 2020. pp.1-8. [Consulta: 18 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jph.12893>

VALDÉS, L.; et al. “Caracterización morfológica, cultural y patogénica de aislados de *Colletotrichum* sp. produciendo antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.)”. *La Granja* [En línea]. 2017, 26(2). pp.38-51. [Consulta: 18 de febrero de 2023]. Disponible en: http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-85962017000100038&lng=es&nrm=iso

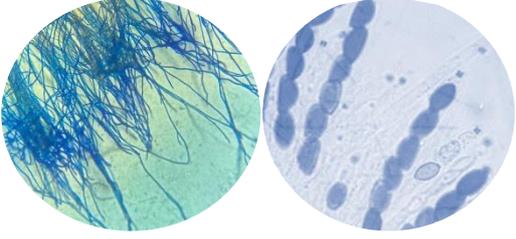
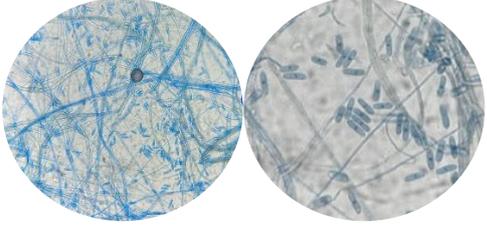
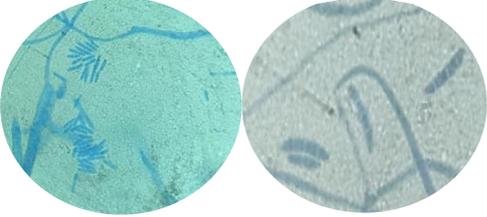
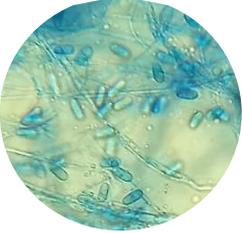
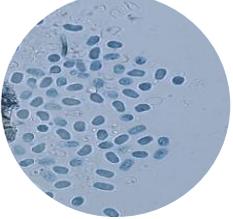
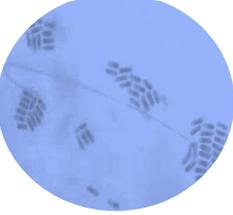
VÁZQUEZ, A. “Técnicas de secuenciación de nueva generación para el estudio del microbioma humano”. *Universits Complvtensis* [En línea], 2018, (Ecuador) 1(1), p.5. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Poster/ANDREA%20VAZQUEZ%20ESCRIBANO.pdf>

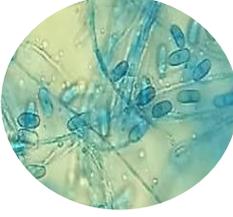
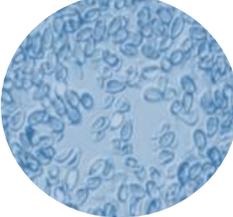
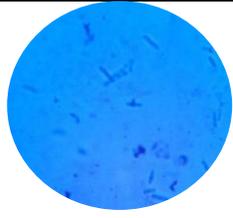
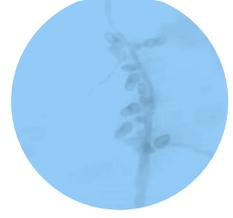
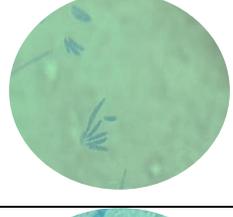
VÉZINA, A. *Morfología de la planta del banano*. 2020. [Consulta: 29 mayo 2022]. Disponible en: <https://www.promusa.org/Morfología+de+la+planta+del+banano#Referencias>

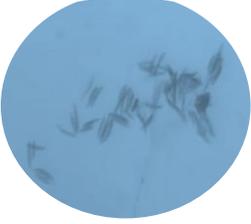
ZAKARIA, L.; & WAN WAN, N. “Identificación Molecular de Hongos Endófitos de Hoja de Banano (*Musa* spp.)”. *Aziz Trop Vida Sci Res* [En línea], 2018, 29(2). pp 201–211. [Consulta: 21 diciembre 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6072729/>

ANEXOS

ANEXO A: CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS AISLAMIENTOS

Aislamiento	Identificación	Caracterización microscópica a 40x.
A-01ABG	<i>Xylaria sp.</i>	
B-02ABG	<i>Collectotrichum sp.</i>	
C-03ABG	<i>Fusarium oxysporum</i>	
D-04ABG	<i>Guignardia sp.</i>	
E-05ABG	<i>Collectotrichum siamense</i>	
F-06ABG	<i>Collectotrichum boninense</i>	
G-07ABG	<i>Collectotrichum sp.</i>	

H-08ABG	<i>Collectotrichum sp.</i>	
I-09ABG	<i>Collectotrichum siamense</i>	
CP-10ABG	<i>Hypoxylon polyporus</i>	
CP-11ABG	<i>Fungal endophyte sp.</i>	
Fr1-12ABG	<i>Epicoccum sorghinum</i>	
Fr2-13ABG	<i>Fusarium equiseti</i>	
CF7Psd-14ABG	<i>Fusarium oxysporum</i>	

CF8Psd-15ABG	<i>Fusarium oxysporum</i>	 A circular inset showing a microscopic view of <i>Fusarium oxysporum</i> . The image displays several long, thin, branching hyphae with a slightly beaded appearance, characteristic of this fungus.
APsd-16ABG	<i>Xylaria multiplex</i>	 A circular inset showing a microscopic view of <i>Xylaria multiplex</i> . The image displays numerous oval-shaped spores with a distinct border and a slightly granular internal texture.

seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas

GenBank Gráficos Distancia árbol de resultados Visor de MSA

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/> Hypoxylon polyporus aislado FL1289 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen de A...	Hypoxylon poly...	1498	1498	100%	0.0	100,00%	1423	JQ760904.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hypoxylon polyporus vale YMJ 84 (JDR) gen de ARN ribosomal 18S. secuencia parcial: espaciad...	Hypoxylon poly...	1493	1493	100%	0.0	99,88%	936	JQ009324.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pyrenopeziza hunteri aislado Phu_ex_1 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen...	Pyrenopeziza...	1472	1472	98%	0.0	99,88%	816	MN733494.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pyrenopeziza hunteri aislado Phu_ex_2 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen...	Pyrenopeziza...	1471	1471	98%	0.0	99,88%	819	MN733495.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hypoxylon polyporus cepa STMA 14090 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen de...	Hypoxylon poly...	1459	1459	98%	0.0	99,50%	817	KU604570.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cultivo de Pyrenopeziza hunteri MUCL:52673 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcia...	Pyrenopeziza...	1456	1456	98%	0.0	99,50%	815	KY610421.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pyrenopeziza hunteri aislado Phu_ex_3 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen...	Pyrenopeziza...	1452	1452	98%	0.0	99,50%	811	MN733496.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hypoxylon polyporus 5.8S rRNA gene ITS1 e ITS2. cepa MUCL 49339	Hypoxylon poly...	1404	1404	100%	0.0	97,80%	880	AM749941.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pyrenopeziza hunteri aislado Phu_ex_4 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen...	Pyrenopeziza...	1395	1395	98%	0.0	98,38%	803	MN733497.1
<input checked="" type="checkbox"/> Colletotrichum sp. aislado PT1629 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen de ARN...	Colletotrichum...	1387	1387	93%	0.0	99,74%	1277	ON154129.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pyrenopeziza hunteri aislado Phu_ex_5 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen...	Pyrenopeziza...	1339	1339	98%	0.0	97,37%	793	MN733453.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hypoxylon nicaraguense gen 5.8S rRNA ITS1 e ITS2. cepa CBS 117739	Pyrenopeziza...	1271	1271	100%	0.0	95,33%	849	AM749922.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hypoxylon polyporus aislado CFE-8 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña. secuencia p...	Hypoxylon poly...	887	1509	100%	0.0	97,32%	932	MH168330.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hypoxylon sp. aislado 3-12-3-7-1 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen de ARN r...	Hypoxylon sp.	741	1270	100%	0.0	92,24%	780	KY069237.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pyrenopeziza nicaraguensis gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña. secuencia parcial:...	Pyrenopeziza...	734	1262	100%	0.0	92,04%	886	MN355519.1

seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas

GenBank Gráficos Distancia árbol de resultados Visor de MSA

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/> Hongo endófito sp. P1512A espaciador transcrito interno 1. secuencia parcial: gen de ARN riboso...	hongos endófit...	981	981	100%	0.0	99,09%	557	EU977315.1
<input checked="" type="checkbox"/> Xylaria longipes voucher GAB197 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña. secuencia parci...	Longipes de Xy...	976	976	100%	0.0	98,90%	596	KY250408.1
<input checked="" type="checkbox"/> Xylaria sp. aislar el gen del ARN ribosomal de la subunidad pequeña MSA02. secuencia parcial: e...	Xylaria sp.	976	976	100%	0.0	98,90%	571	OP559516.1
<input checked="" type="checkbox"/> Xylaria sp. E10214a gen de ARN ribosomal 18S. secuencia parcial: espaciador interno transcrito 1...	Xylaria sp. E10...	970	970	100%	0.0	98,72%	561	JN418792.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hongos sp. gen de ARN ribosomal ARIZ L192 18S. secuencia parcial: espaciador interno transcrit...	hongos sp. ARI...	970	970	100%	0.0	98,72%	603	FJ612722.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hongo endófito sp. P905A espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen de ARN ribosom...	hongos endófit...	970	970	100%	0.0	98,72%	554	EU977239.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hongos sp. aislado E3124F espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen de ARN riboso...	hongos sp.	968	968	100%	0.0	98,72%	545	KT996058.1
<input checked="" type="checkbox"/> Aislado de endófito fúngico 1988 Gen de ARN ribosomal 18S. secuencia parcial: espaciador intern...	endofito fúngico	966	966	99%	0.0	98,89%	1087	EU887008.1
<input checked="" type="checkbox"/> Xylariaceae sp. cepa PB-85 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña. secuencia parcial: esp...	Xylariaceae sp.	965	965	100%	0.0	98,53%	569	MK334005.1
<input checked="" type="checkbox"/> cultivo de Xylaria enteroleuca CBS:128357 cepa CBS 128357 gen de ARN ribosomal de subunida...	Xylaria enterole...	965	965	100%	0.0	98,53%	588	MH864898.1
<input checked="" type="checkbox"/> Xylaria berteroi aislado J132 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña. secuencia parcial: es...	Xylaria berteroi	965	965	100%	0.0	98,53%	588	MH151036.1
<input checked="" type="checkbox"/> Vale de Xylaria allantoides INBio:1098A espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen de...	Xylaria allantoi...	965	965	100%	0.0	98,53%	558	KR534643.1
<input checked="" type="checkbox"/> Hypoxylon sp. vale biocódigo09-255 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen de AR...	Hypoxylon sp.	965	965	100%	0.0	98,53%	1102	MZ997289.1

seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas

GenBank Gráficos Distancia árbol de resultados Visor de MSA

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium equiseti cepa TH01-3-1 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña. secuencia parci...	Fusarium equi...	950	950	100%	0.0	100,00%	545	MT558576.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium equiseti cepa DH14-1 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña. secuencia parcial:...	Fusarium equi...	950	950	100%	0.0	100,00%	560	MT558570.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium sp. cepa ZMXR12 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña. secuencia parcial: esp...	Fusarium sp.	950	950	100%	0.0	100,00%	570	MT446117.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium sp. Genes FH22 para ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA. secuencia parcial y completa	Fusarium sp.	950	950	100%	0.0	100,00%	525	LC543660.1
<input checked="" type="checkbox"/> Colección de investigación de vales de Penicillium aethiopicum Farrer lab 61 espaciador interno tra...	Penicillium aet...	950	950	100%	0.0	100,00%	1063	MN644630.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium sp. aislar el gen del ARN ribosomal de la subunidad pequeña H5. secuencia parcial: espa...	Fusarium sp.	950	950	100%	0.0	100,00%	551	MT261909.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña LXC5 aislado de Fusarium incarnatum. secuencia...	Fusarium enca...	950	950	100%	0.0	100,00%	581	MT106896.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium incarnatum cepa YH Yeh 11129 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña. secueni...	Fusarium enca...	950	950	100%	0.0	100,00%	552	MK336548.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium equiseti 19MSr-B3-4 genes para 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA. secueni...	Fusarium equi...	950	950	100%	0.0	100,00%	551	LC514690.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium incarnatum cepa DTO 417-F2 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña. secuencia...	Fusarium enca...	950	950	100%	0.0	100,00%	804	MN882828.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium verticillioides cepa WZ-156 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña. secuencia pa...	Fusarium verti...	950	950	100%	0.0	100,00%	554	MN856297.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium equiseti cepa p5 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña. secuencia parcial: espac...	Fusarium equi...	950	950	100%	0.0	100,00%	556	MN795741.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium equiseti aislado 3100006L5 espaciador interno transcrito 1. secuencia parcial: gen de AR...	Fusarium equi...	950	950	100%	0.0	100,00%	528	MN559645.1

seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas

[GenBank](#)
[Gráficos](#)
[Distancia árbol de resultados](#)
[Visor de MSA](#)

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/> Gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña N-61-2 aislado de <i>Fusarium oxysporum</i> , secuencia...	<i>Fusarium oxys...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	585	MT560381.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> aislado N-60-1 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia pa...	<i>Fusarium oxys...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	584	MT560380.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña N-19-2 aislado de <i>Fusarium oxysporum</i> , secuencia...	<i>Fusarium oxys...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	583	MT560342.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> clon SF_942 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	555	MT530218.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> clon SF_869 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	556	MT530145.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> clon SF_820 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	553	MT530096.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> clon SF_270 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	557	MT529546.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> clon SF_248 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	561	MT529524.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> cepa 4151 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parcial;...	<i>Fusarium oxys...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	542	MN817703.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> cepa W614 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	946	946	100%	0.0	100,00%	533	MK805518.1

seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas

[GenBank](#)
[Gráficos](#)
[Distancia árbol de resultados](#)
[Visor de MSA](#)

Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/> Gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña N-61-2 aislado de <i>Fusarium oxysporum</i> , secuencia...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	585	MT560381.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> aislado N-60-1 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia pa...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	584	MT560380.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña N-19-2 aislado de <i>Fusarium oxysporum</i> , secuencia...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	583	MT560342.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> clon SF_942 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	555	MT530218.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> clon SF_869 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	556	MT530145.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> clon SF_820 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	553	MT530096.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> clon SF_270 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	557	MT529546.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> clon SF_248 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	561	MT529524.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> cepa 4151 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parcial;...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	542	MN817703.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> cepa W614 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parci...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	533	MK805518.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lactucae cepa raza 5 gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña, se...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	526	MT249304.1
<input checked="" type="checkbox"/> aislado de <i>Fusarium oxysporum</i> K95 ITS_H01_001.ab1 gen de ARN ribosomal de subunidad pequ...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	534	MT032869.1
<input checked="" type="checkbox"/> aislado de <i>Fusarium oxysporum</i> 2016_F_94 ITS1_H06_017.ab1 gen de ARN ribosómico de subun...	<i>Fusarium oxys...</i>	948	948	100%	0.0	100,00%	534	MT032620.1

ANEXO C: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN (PURELINK KIT EXTRATION (INVITROGEN))

Antes de empezar

Binding Buffer (B4)

Agregue 11,5 ml de etanol al 96–100% a 7,5 ml de tampón de unión (B4) incluido con el kit. Mezclar bien y almacenar el Binding Buffer (B4) con etanol a temperatura ambiente.

Wash Buffer (W5)

Añada 40 ml de etanol al 96–100% a 10 ml de tampón de lavado (W5) incluido con el kit. Almacene el tampón de lavado (W5) con etanol a temperatura ambiente.

Preparing Plant Lysate

Utilice el siguiente procedimiento para preparar lisado a partir de ≤ 100 mg de tejido vegetal.

1. Para tejido vegetal duro, congele el tejido en nitrógeno líquido y tritúrelo hasta convertirlo en polvo.

Para obtener tejido vegetal suave y no fibroso, córtelo en trozos pequeños.

Para muestras liofilizadas, continúe con el Paso 2.

2. Agregue 250 μ L de tampón de resuspensión (R2) suministrado en el kit al tejido del Paso 1 a temperatura ambiente.

3. Prepare el lisado homogeneizando el tejido blando con un homogeneizador de tejido o agitando en vórtex el tejido molido / muestra liofilizada hasta que la muestra esté completamente resuspendida.

4. Añada 15 μ L de SDS al 20% y 15 μ L de RNasa A (20 mg / ml) suministrados en el kit al lisado.

5. Incubar el lisado a 55 ° C durante 15 minutos para completar la lisis.

6. Centrifugue el lisado a alta velocidad durante 5 minutos para eliminar los materiales insolubles.

7. Transfiera el sobrenadante transparente a un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml sin alterar el sedimento.

8. Añada 100 μ L de tampón de precipitación (N2) suministrado con el kit al lisado transparente. Mezclar con vórtex e incubar en hielo durante 5 minutos.

Las proteínas y los polisacáridos se precipitan y los pigmentos fotosintéticos que están unidos a las proteínas también se eliminan con este paso. Los pigmentos pueden manchar el material del cartucho giratorio PureLink® que puede producir eluato de color.

9. Centrifugar a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 5 minutos a temperatura ambiente para producir un lisado transparente. Nota: El sobrenadante debe ser transparente y no viscoso después de este paso de precipitación.

10. Transfiera 250 μL de lisado transparente a un tubo de microcentrífuga nuevo y estéril y agregue 375 μL de tampón de unión (B4) con etanol (página anterior)

Binding DNA (Unión)

1. Saque del paquete un cartucho giratorio PureLink® en un tubo colector.
2. Agregue la muestra con Binding Buffer del paso 10, página anterior al cartucho giratorio PureLink®.
3. Centrifugue el cartucho a $10.000 \times g$ durante 30 segundos a temperatura ambiente.
4. Deseche el flujo a través y coloque el cartucho de centrifugado en el tubo de lavado suministrado con el kit. Proceda a lavar el ADN.

Washing DNA

Agregue 500 μL de tampón de lavado (W4) suministrado en el kit al cartucho.

2. Centrifugue el cartucho a $10.000 \times g$ durante 30 segundos a temperatura ambiente. Deseche el flujo a través del tubo de lavado y vuelva a colocar la columna en el tubo.
3. Añada 500 μL de tampón de lavado (W5) con etanol (página 12) a la columna.
4. Centrifugue el cartucho a $10.000 \times g$ durante 30 segundos a temperatura ambiente. Deseche el flujo a través del tubo de lavado y vuelva a colocar el cartucho en el tubo.
5. Repita los pasos 3 a 4 una vez más.
6. Centrifugue el cartucho a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente para eliminar cualquier tampón de lavado residual (W5). Deseche el tubo de lavado. Continúe con Elución de ADN, página 14.

Eluting DNA

1. Coloque el cartucho de centrifugado en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril y sin ADNasa.

2. Añada 100 μL de tampón de elución (E1) o agua destilada estéril ($\text{pH} > 7,0$).
 3. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugue el cartucho a velocidad máxima durante 1 minuto. El tubo de elución contiene el ADN purificado.
 4. Para recuperar más ADN, realice un segundo paso de elución con 100 μL de tampón de elución (E1) o agua esterilizada. Puede realizar la segunda elución utilizando el mismo tubo de elución o en un tubo diferente.
 5. Centrifugue la columna a temperatura ambiente a velocidad máxima durante 1 minuto. El tubo de elución contiene el ADN purificado. Retire y deseche el cartucho.
- Según el volumen de tampón de elución utilizado para la elución, la recuperación del volumen de elución variará y suele ser $> 95\%$ del volumen de tampón de elución utilizado.

Almacenamiento de ADN

Almacene el ADN purificado a -20°C o utilice ADN para la aplicación posterior deseada.

- Para almacenamiento a largo plazo, almacene el ADN purificado en Tampón de elución (E1) a -20°C , ya que el ADN almacenado en agua está sujeto a hidrólisis ácida.
- Para evitar la congelación y descongelación repetidas del ADN, almacene el ADN purificado a 4°C para su uso inmediato o tome alícuotas del ADN y almacénelo a -20°C para un almacenamiento a largo plazo.

**ANEXO D: SECUENCIAS DE LA REGIÓN TRANSCRITO INTERNA (ITS),
AMPLIFICADA MEDIANTE CEBADORES ITS1 E ITS4,
CORRESPONDIENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS EN CULTIVOS
DE BANANO DE LA ISLA SANTA CRUZ, GALÁPAGOS,2021**

C-03ABG

ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTAACGGC
GTGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCAA
TCAATTTGGGGAACGCGAATTAACGCGAGTCCCAACACCAAGCTGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCT
CGAACAGGCATGCCCCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATCACTGAA
TTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGTGCTGCTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGT
TGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGTCTCTGG
CGGGCCGTCCTTTTACCGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACAAGTGGTATGTTACAGGGGTT
TGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCC

E-05ABG

GATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTTGGAAAATTGGGGTTTTAC
GGCAAGAGTCCCTCCGATCCCAGTGCGAGACGTAAAGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGAGAGGGT
CCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGCCCCAACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAA
ATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGAT
TCACTGAATCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAG
ATCCGTTGTTAAAAGTTTTGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGT
TATCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCGGAGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCGCGGAGACCTACCCGC
CGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTACAAAGGGTTGTAGAGCGTAACTCAGTAATGATCCCT

I-09ABG

GGAGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGG
GTAGGGTCTCCGCGACCCTCCCGCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGAGGATAACCAA
ACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAACAACGGATCTCTT
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCA
ACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCT
CTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTA AAAAC
CCCCAATTTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATA

CP-10ABG

CTAGATGTATAGGGGTTTTACGGCAGGAAGCCAGGTACACCACAGAAGCGAGAATAGCTTACTACGCT
TAGAGTGTGCCCTAGCTCCGCCACTAAGTTTGGAGAACTGCGCCCCTAGGGGACGCAGGCTCCCAACG
CTAAGCAACGAGGGCTTAAGGGTCGAAATGACGCTCGAATAGGCATGCCACTAGAACTAATGGGC
GCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAGTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTCGCTGC
GTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTTAATTGAAGTAATTC
AGAAAAAAAAAATAAGCTTTTGGAGCTTCATTTGAGCTTTGGAGCATTATTTTCGAGCAAGCTTTGG
AGCAGAATCCTTTTTTCGAGCAAAGCTTTGGAAGTTTTTCGAGCTTTGGAGCTTCTTCGAGCGAG
CTTTGGAGCAGGATCTTCGAGCTTTGGAGCAGGATTTTCGAGCTTTGGAGCAGGATTTTCGAGCGAG
CTTTGGAGCAGGATCTTTTTTCGAGCTTTGGAGCTTTTTTCGAACAGGCTTTGGAGCGGAAATTTTTG
AAGCTTTTCGAGCTTTTTTCGAGCAAGAGTTTGAACGGTCTCCGGCGGGCCATATAGCGCGCGCCGA
CAGCTGCCCTGAAGGGCGGGCGCCGCGGGTAGGTCTACTGCGGGTAGCCTTCCCCGGGTGCGC
CGCCGAGGGTAGCTGCAGGGCACGCGGGCTCACGCCGAGGCAACGACGGTAA

CP-11ABG

CGGAGGGATCATTAAAGAGTTCTATAACTCCCAAACCCATGTGAACATACCTTACGTTGCCTCGGCAGG
TCGCGCTACCTCGTAGCGCCCTACCCTGTAGGGCTACCCGGGAGACGCGGGTAAGCCTGCCGGCGG
CCCACGAAACTCTGTTAATATTGAATTCTGAATATATAACTAAATAAGTTAAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TTCAACCTTAAGCCTCTGTTGCTTAGTGTTGGGAGCCTACAGCACCTGTAGCTCCTCAAAGTTAGTGGC
GGAGTCGGTTCACACTCTAGACGTAGTAATTCTATCTCGCCTATTAGTTGGACCGGTCCCCTGCCGTA
AACCCCTACTTTAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

Fr2-13ABG

ATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACATTGAGAAGTTGGGGTTTAAACGGCGT
GGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGTGTATGATTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAAT
CGATTTGGGGAACGCGGGTTACC GCGAGTCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTC
GAACAGGCATGCCC GCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAAT
TCTGCAATTCACATTACTTATCGATTTTGTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTTTGATTTATTTGTTTACTCAGAAGTTCCACTAAAAACAGAGTTTAGGGGTCTCGGGC
GGGCCGTCCCGTTTTACGGGGCGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACGTATAGGTATGTTACAGGGGTT
TGGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCCG

CF7Psd-14ABG

TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACATTGAGAAGTTGGGGTTTAAACGGCG
TGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATC
AATTTGGGGAACGCGAATTAACGCGAGTCCCAACACCAAGCTGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCG
AACAGGCATGCCC GCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAAT
CTGCAATTCACATTACTTATCGATTTTGTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCTCTGGC
GGGCCGTCCCGTTTTACGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACAAGTGGTATGTTACAGGGGTTT
GGGAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCC

CF8Psd-15ABG

TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCCGAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTTAACGGCG
TGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATC
AATTTGGGGAACGCGAATTAACGCGAGTCCCAACACCAAGCTGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCG
AACAGGCATGCCCCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATT
CTGCAATTCACACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGC
GGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACAAGTGGTATGTTACAGGGGTTT
GGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCG

**ANEXO E: SECUENCIAS REFERENCIA DE LA REGIÓN TRANSCRITA INTERNA (ITS),
OBTENIDAS A PARTIR DE GENBANK**

Accesión en GenBank	Identificación
MT560381.1	<i>Fusarium oxysporum</i>
MT450691.1	<i>Collectotrichum siamense</i>
MT450691.1	<i>Collectotrichum siamense</i>
JQ760904.1	<i>Hypoxyton polyporus</i>
ECU977315.1	<i>Fungal endophyte sp.</i>
MT558570.1	<i>Fusarium equiseti</i>
MT560381.1	<i>Fusarium oxysporum</i>
MT560381.1	<i>Fusarium oxysporum</i>



esPOCH

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 05 / 04 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Abigail Lucía Chancusig Proaño
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Ingeniería en Biotecnología Ambiental
Título a optar: Ingeniera en Biotecnología Ambiental
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo

0606-DBRA-UPT-2023