

29

EVALUACIÓN DEL DESARROLLO
DE MICELIOS DE MYCOSPHAERELLA FIJENSIS MORELET,
RECOLECTADOS EN EL CENTRO Y LINDERO EN PLANTACIÓN
DE MUSA SP. AAA

EVALUACIÓN DEL DESARROLLO

DE MICELIOS DE MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS MORELET, RECOLECTADOS EN EL CENTRO Y LINDERO EN PLANTACIÓN DE MUSA SP. AAA

EVALUATION OF THE DEVELOPMENT OF MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS MORELET, COLLECTED IN THE CENTRE AND LINDER IN PLANTING OF MUSA SP. AAA

Abraham Rodolfo Cervantes Alava¹

E-mail: acervantes@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6223-8661>

Yimabel Lalangui Paucar²

E-mail: yjlangui@uce.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0688-9432>

Adriana Beatriz Sánchez Urdaneta³

E-mail: usanchez@fa.luz.edu.ve

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3108-0296>

Ciols Beatriz Colmenares de Ortega³

E-mail: ciolysc@fa.luz.edu.ve

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8545-2959>

Edwin Edison Jaramillo Aguilar¹

E-mail: ejaramillo@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8241-9598>

¹ Universidad Técnica de Machala. Ecuador.

² Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador.

³ Universidad de Zulia. Maracaibo. Venezuela.

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Cervantes Alava, A. R., Lalangui Paucar, Y., Sánchez Urdaneta, A. B., Colmenares de Ortega, C. B., & Jaramillo Aguilar, E. E. (2020). Evaluación del desarrollo de micelios de *Mycosphaerella Fijiensis* Morelet, recolectados en el centro y lindero en plantación de *Musa* sp. AAA. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(3), 246-252.

RESUMEN

En el estudio se evaluó el medio de desinfección para obtener micelios in vitro de *M. fijiensis*, en muestras de hojas de banano (*Musa* sp. AAA) recolectadas en el centro (BI) y el lindero (AI) de la bananera, de la Hacienda El Playón, canton Pasaje, provincia de El Oro. Para la descarga de las ascosporas en el laboratorio se realizaron en cámara húmeda cortes de hojas de 7 x 7 cm con síntomas de SN dentro de contenedores de plásticos con capacidad de 500 mL y se incubaron por 72 horas. Las muestras de los fragmentos se colocaron en agua destilada estéril en papel filtro estéril para eliminar residuos de agua y con ayuda de un escalpelo se procedió a sembrar en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) en cajas de Petri, selladas con papel parafilm, luego fueron colocadas a incubarse por 7, 14 y 21 dds, a una temperatura promedio de 27 °C ± 2°C. El diseño experimental fue totalmente al azar, con seis tratamientos y tres repeticiones, conformada cada una por 30 cajas de Petri. Se presentaron diferencias estadísticas por efecto de los tratamientos ($P < 0,01$) para la germinación y el crecimiento de los micelios. Los tratamientos T5L y T6C (desinfección con agua destilada estéril + 1 minuto de inmersión) presentaron entre 93 y 100% de germinación y crecimiento de micelios a los 21 dds entre 23 y 24 mm para garantizar un cultivo axénico.

Palabras clave:

Mycosphaerella fijiensis, alta y baja incidencia, medios de cultivo, micelios.

ABSTRACT

The study evaluated the disinfection medium to obtain in vitro mycelia of *M. fijiensis*, in samples of banana leaves (*Musa* sp. AAA) collected in the center (BI) and the border (AI) of the banana, of the Hacienda El Playón, Pasaje canton, El Oro province. In order to unload the ascospores in the laboratory, cuttings of 7 x 7 cm leaves with SN symptoms were made in plastic containers with a capacity of 500 mL and incubated for 72 hours. The samples of the fragments were placed in sterile distilled water on sterile filter paper to remove water residues and with the help of a scalpel, they were sown in potato-dextrose-agar (PDA) culture medium in Petri dishes, sealed with paper parafilm, then they were placed to incubate for 7, 14 and 21 dds, at an average temperature of 27 °C ± 2 °C. The experimental design was completely randomized, with six treatments and three repetitions, each consisting of 30 Petri dishes. Statistical differences were presented due to the effect of the treatments ($P < 0.01$) for the germination and growth of the mycelia. Treatments T5L and T6C (disinfection with sterile distilled water + 1 minute immersion) showed between 93 and 100% germination and mycelia growth at 21 dds between 23 and 24 mm to guarantee an axenic culture.

Keywords:

Mycosphaerella fijiensis, high and low incidence, culture media, mycelium.

INTRODUCCIÓN

Sigatoka negra (SN, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet) es una enfermedad que afecta el tejido foliar en las plantas de banano (*Musa* AAA), reduce la fotosíntesis y disminuye el rendimiento del cultivo. El control fitosanitario se ha basado en el uso de fungicidas comerciales, entre los más comunes, de origen químico están las aminas, triazoles, estrobilurinas, anilino pirimidinas, carboxamidas y guanidinas (Robinson & Galán, 2012). Aunque el uso de fungicidas, ha permitido enfrentar a la SN, este tipo de control presenta desventajas sobre el ambiente, sumado a la resistencia adquirida por el patógeno debido a la aplicación continua de ciertos fungicidas sistémicos, como benzimidazoles y más recientemente con la aparición del grupo químico de los triazoles (Cuellar, Álvarez & Castaño, 2011).

Sigatoka negra se reproduce en forma asexual (conidios) y sexual (ascosporas), ambas desempeñan papeles importantes en la propagación de la enfermedad; además, existen varios estadios que se desarrollan en las hojas, descritos de la siguiente manera: 1) se refiere a la presencia de puntos dispersos; 2) pizca; 3) estría y el estadio 4) mancha. El control químico de SN depende de varios factores, el monitoreo de las hojas 3 y 4 en la plantación, llevar registro de los datos del preaviso biológico, la evaluación de Stover, preaviso meteorológico y revisar el calendario de rotación de los diferentes grupos químicos, tales como: inhibidores de demetilación (DMIs), inhibidor mitocondrial de la respiración celular (Qols), aminas, anilino pirimidinas (APs), inhibidor del proceso de succinato deshidrogenasa (SDHI), guanidinas, N-fenilcarbamatos y fungicidas multisitios o protectantes (Mauguashca, 2018); no obstante, existen otras metodologías de evaluación de los daños que involucran de la hoja 3 a la 5.

Quevedo, Infantes & García (2018), mencionaron que el combate químico es la principal herramienta para el control de SN en banano y su uso debe seguir los lineamientos del Comité Técnico de Resistencia a Fungicidas (FRAC); indicaron además, que el riesgo a la resistencia de los fungicidas está determinado para cada grupo químico; por ejemplo, para inhibidores de la desmetilación (IDM) el riesgo es medio, para los fungicidas inhibidores de la quinona (Qo) o estrobilurina es alto, para el grupo aminas esta reportado como medio, las anilino pirimidinas (APs) es medio-alto, los fungicidas inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHI, por sus siglas en inglés) es bajo-medio y para las guanidinas hasta la fecha aún es bajo. Por lo que, el control de SN requiere cada vez, de más aplicaciones de fungicidas debido a la resistencia de este patógeno.

En este mismo sentido, la utilización de fungicidas sistémicos y protectantes en emulsiones, o en mezcla con aceite mineral, para disminuir el daño en las hojas; aunado al solapamiento de los productos aplicados con presencia de aceite mineral y además, las continuas

aplicaciones, sugiere un impedimento para la penetración de la luz solar a las hojas, lo cual afecta el contenido de clorofila en las mismas y como consecuencia de ello, los rendimientos del cultivo (Cervantes, Sánchez-Urdaneta & Colmenares, 2019).

Por otro lado, Sepúlveda (2016), realizó aislamientos monospóricos de *M. fijiensis* para conocer su sensibilidad poblacional e individual a los fungicidas piraclostrobin, epoxiconazol y tridemorf, concluyendo que la mayor sensibilidad se presentó para piraclostrobin y epoxiconazole, mientras que tridemorf presentó sensibilidad de baja a alta simultáneamente entre los individuos. Los estudios *in vitro* de *M. fijiensis*, permiten conocer la probabilidad de infección, la velocidad de la colonización del hongo, mutación y esporulación en plantas hospederas. Una mutación tiene una adaptación reducida mientras que las poblaciones con la cepa sensible se pueden establecer como una población resistente bajo selección. Una resistencia individual (resistencia de laboratorio) se refiere al individuo, clon, aislado o raza, bajo condiciones controladas que son inhibidos por la mayor concentración aplicada de los fungicidas en comparación con el tipo sensible original (Pérez-Vicente, 2013).

Por lo antes expuesto, se evaluó el medio de desinfección para obtener micelios *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, en muestras de hojas de banano (*Musa* sp. AAA) recolectadas en el centro (BI) y el lindero (AI) de la bananera, de la Hacienda El Playón, canton Pasaje, provincia de El Oro.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó durante 60 días, en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Técnica de Machala (UTMACH), ubicada a 79°54'05" O y 3°17'16" S, a una altura de 5 msnm, en la parroquia El Cambio, cantón Machala, provincia de El Oro, Ecuador.

El material vegetal fue recolectado en la Hacienda El Playón, del cultivar de banano 'Williams'. Las muestras de campo, se seleccionaron a los 180 días después de haber aplicado los tratamientos con fungicidas en mezclas de cuatro ciclos: Epoxiconazole + Tridemorf; Espiroxamina + Pirimetanil; Difeconazol + Tridemorf y Fenpropimorf + Pirimetanil. Las muestras de hojas, tuvieron un tamaño de 40 cm de largo, con síntomas de SN (estado de mancha 5 y 6), que fueron recolectadas de plantas seleccionadas en diferentes líneas de vuelo del avión, en total se tomaron dos muestras: una en el centro de la bananera, codificada como bajo impacto (BI) y la otra del lindero o alto impacto (AI), la biomasa total de cada muestra fue de 4 kg·ha⁻¹.

Para evaluar el desarrollo de los micelios, se confirmó la presencia de peritecios en las muestras de hojas de banano, en el laboratorio de Fitopatología Utmach, luego de 24 horas de almacenar las muestras en cámara húmeda a temperatura de 27 °C ± 2°C. Para analizar la presencia de los peritecios, se emplearon fragmentos de hojas de 4

x 4 cm, con estadios de SN, estado de mancha 6 (figura 1A), que fueron examinadas en la cara adaxial de la hoja, con un microscopio óptico, marca Amscope con aumento de 40X, tanto para las muestras del centro y el lindero.

Para evaluar los tres medios de desinfección, se tomaron 30 fragmentos de hojas con cortes de 7 x 7 cm, con síntomas de SN (estado de manchas 5 y 6). Todas las muestras primero, fueron sometidas a un proceso de lavado con agua corriente por 1 minuto luego se procedió a desinfectarlas con ayuda de algodón y alcohol, posterior a ello los fragmentos de hojas se colocaron en agua destilada estéril por 20 minutos, se dejaron escurrir en papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua. Luego se desinfectaron según los tratamientos establecidos (tabla 1) y se colocaron en 30 contenedores de plástico de 500 mL (15 fragmentos del lindero y 15 del centro, figura 1B) y se incubaron por 72 horas respectivamente en una incubadora Incucell a una temperatura promedio de 27 °C ± 2°C.

Tabla 1. Distribución de los tratamientos según el tipo de desinfección, sitio de muestreo de hojas de banano (AI-BI) y tiempo, en muestras recolectadas en la Hacienda El Playón, parroquia La Peaña, cantón Pasaje, provincia de El Oro, Ecuador.

Tratamiento	Desinfección	Zona de aplicación	Tiempo de inmersión (minutos)
T1	Etanol 70% e hipoclorito de sodio al 1%	Lindero	5
T2	Etanol 70% e hipoclorito de sodio al 1%	Centro	5
T3	Etanol 70% e hipoclorito de sodio al 1%	Lindero	8
T4	Etanol 70% e hipoclorito de sodio al 1%	Centro	8
T5	Desinfección con agua destilada	Lindero	1
T6	Desinfección con agua destilada	Centro	1

Transcurrido el tiempo de incubación (72 horas) los contenedores de 500 mL, fueron llevadas a una cámara de flujo laminar marca **Clean Bench** y se tomaron dos fragmentos de hojas de 1 cm² de tamaño, luego se sumergieron en agua destilada estéril. Con ayuda de un escalpelo esterilizado se procedió a sembrar los fragmentos de hojas, según el sitio de muestreo (lindero, AI y centro, BI) en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) aséptico, en cajas de Petri, para la siembra se seleccionaron áreas de estructuras reproductivas estadio 6 (*M. fijiensis*), luego fueron selladas con papel parafilm y se llevaron a

incubación por 7, 14 y 21 días, respectivamente, en una incubadora Incucell a una temperatura promedio de 27 °C ± 2°C, para el registro de los datos respectivos.

Se pesaron 39 g de PDA y se colocaron en 1000 mL de agua destilada, se agitó con la ayuda de una varilla de vidrio y se llevó a fuego hasta llegar a punto de ebullición, se selló el recipiente con una torunda de algodón y papel de aluminio, se colocó en una funda para esterilizar y se llevó a autoclavar a 121 °C por 20 minutos. Una vez esterilizado el medio de cultivo se llevó a la cámara de flujo laminar, para dispensar el PDA en las cajas de Petri previamente esterilizadas, se colocaron 20 mL en cada una ellas, dentro de la cámara de flujo laminar para su solidificación y su posterior uso.

La identificación de los micelios de *M. fijiensis*, se realizó tomando muestras de las cajas de Petri después de 30 días de incubación (figura 1D) en medio de cultivo PDA, con ayuda de un escalpelo se extrajo una muestra de micelio de *M. fijiensis*, se colocó la muestra en un cubreobjeto y para mejorar la visualización de los tejidos se tiñó el micelio con azul de metileno (figura 1E), luego se llevó la muestra para proceder a la observación en un microscopio óptico (Amscope) con un aumento de 40X (figura 1F), en las muestras de hojas de banano provenientes del centro y lindero de la Hacienda El Playón.

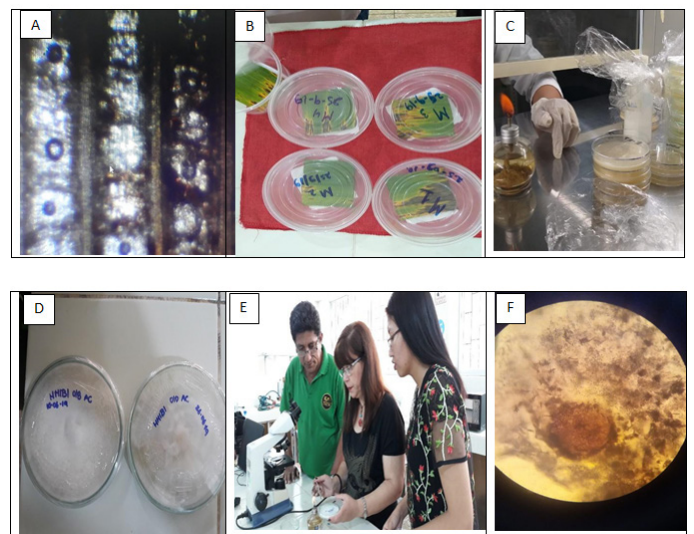


Figura 1. A. Peritecios de Sigatoka Negra vistos al microscopio. B. Fragmentos de hojas de 7 x 7 cm en fase de desinfección con agua destilada en contenedores de plástico de 500 mL. C. Cajas de Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA) en cámara de flujo laminar. D. Micelio desarrollado durante 30 días en el Laboratorio de Fitopatología UTmach. E. Identificación de micelios de *Mycosphaerella fijiensis*, 30 días después de la incubación. F. Peritecio en formación visto al microscopio óptico Amscope 40X.

Cada tratamiento se identificó según el sitio de muestreo (tabla 1). El experimento contó con 90 cajas de Petri (30 por repetición), posteriormente se incubaron por 30 días a temperatura promedio de 27 °C ± 2°C. El crecimiento

del micelio germinado de *M. fijiensis* se registró individualmente midiendo con una regla en la base de las cajas de Petri, según cada tratamiento de forma individual, cada siete días por tres semanas continuas (figura 2A y 2B).

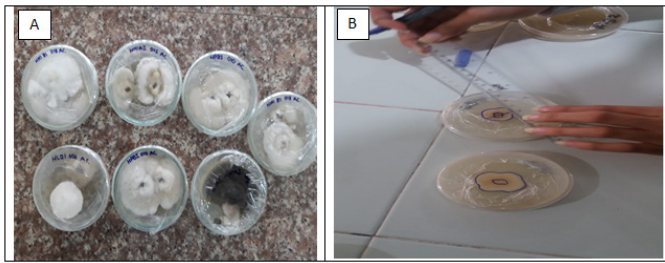


Figura 2. A. Micelios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, después de 21 días de incubación. B. Medición de desarrollo de micelios, en el Laboratorio de Fitopatología, Universidad Técnica de Machala (Utmach).

El diseño experimental fue totalmente al azar, con seis tratamientos y tres repeticiones, cada repetición estuvo conformada por 30 cajas de Petri, con micelios obtenidos del centro y lindero de la Hacienda El Playón. El análisis de los datos fue realizado utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS CENTURION.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cultivos de micelios de *M. fijiensis* mostraron diferencias estadísticas ($P < 0,0001$) tanto en la germinación como en el crecimiento de los mismos. Para la germinación de los micelios se formaron dos grupos a los 7 días después de la siembra (dds), uno con los tratamientos de desinfección con etanol 70% + hipoclorito de sodio al 1%, en la zona de aplicación de lindero y centro, durante 5 y 8 minutos (tratamientos: T1L, T2C, T3L y T4C), sin diferencias estadísticas entre ellos, estos presentaron diferencias estadísticas con el otro grupo, integrado por los tratamientos de desinfección con agua destilada esteril durante 1 minuto (tratamientos T5L y T6C), sin diferencias estadísticas entre estos dos últimos (figura 3).

Aun cuando los tratamientos T1 al T4 no fueron diferentes estadísticamente el tiempo de inmersión de 8 minutos generó menor porcentaje de germinación de los micelios (48,33% tanto para T3L como para T4C), mientras que para T1L y T2C los valores de germinación fueron de 56,67 y 61,67; respectivamente. Por el contrario, T5L y T6C presentaron los mayores valores de germinación (83,33% para ambos tratamientos). Esto evidenció que el agua destilada esteril no inhibió la germinación de las ascosporas del hongo.

A los 14 dds el análisis indicó diferencias similares a las observadas a los 7 días, donde igualmente se conformaron dos grupos; sin embargo, el comportamiento entre los tratamientos fue diferente, destacando que en este caso cuando el tiempo de inmersión fue de 8 minutos, la germinación de los micelios fue mayor. Esto es, para T3L y T4C la germinación fue de 73,33%, mientras que para T1L

y T2C fue de 61,67 y 66,67; respectivamente, con lo cual a los 8 minutos de inmersión no se inhibió la germinación de los micelios (figura 3). En este caso, también, T5L y T6C fue superior la germinación de los micelios con valores de 93,33 y 100%, respectivamente.

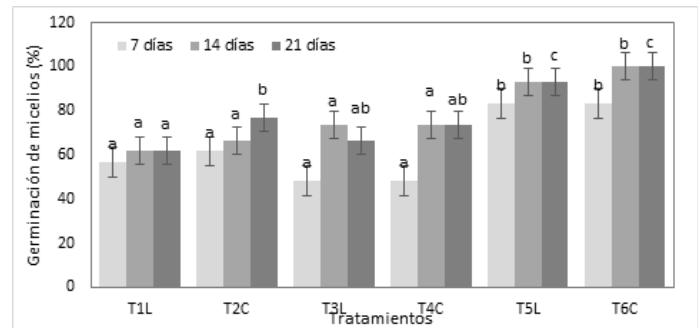


Figura 3. Germinación de micelios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (%), creciendo en cajas de Petri, en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) a los 7, 14 y 21 días después de la siembra, bajo seis tratamientos (desinfección *in vitro*, tiempos de inmersión y sitios de aplicación de fungicidas), obtenidos en el Laboratorio de Fitopatología, Universidad Técnica de Machala (Utmach), en la Hacienda El Playón, Provincia de El Oro, Machala, Ecuador. Letras diferentes entre las barras del mismo color presentaron diferencias estadísticas.

Se destacó que a los 21 dds se presentaron diferencias estadísticas entre T1L y T2C ($P < 0,01$) con valores de 61,67 y 76,67; respectivamente. Coincidiendo con lo reportado por Adirano-Anaya, et al. (2018) quienes indicaron que al aislar colonias de micelios de *M. fijiensis* en medio de cultivo PDA, a partir de hojas de banano con síntomas de SN, lavadas con agua más detergente y sometidas a un proceso de asepsia (inmersión en hipoclorito de sodio al 5%, por 5 minutos e inmersión en etanol al 70%, por 5 min y enjuagadas con agua esterilizada), estas alcanzaron un crecimiento hasta de un 60,4%. Por otro lado, T3L y T4C fueron estadísticamente similares entre ellos, pero a su vez fueron similares a T1L y T2C ($P > 0,05$), por último T5L y T6C no presentaron diferencias estadísticas entre ellos, pero fueron diferentes a T1L, T2C, T3L y T4C (Figura 3).

Con relación a el crecimiento de los micelios a los 7 dds no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos, con valores entre 4,60 y 4,97 mm. Sin embargo, T2C, T5L y T6C fueron los que alcanzaron el mayor crecimiento del micelio (figura 4).

Tanto a los 14 y 21 dds se observó similar comportamiento de los tratamientos, conformándose en ambas fechas dos grupos. Un grupo constituido por T1L, T2C, T3L y T4C sin diferencias estadísticas entre ellos, pero diferentes al otro grupo que lo formaron T5L y T6C, sin diferencias estadísticas entre estos dos últimos. Se destaca que a los 21 días en T6C el crecimiento del micelio fue 2,83 veces mayor que en T6C a los 14 días, igualmente T6C a los 21 dds fue 3,53 veces mayor que T3L a los 14 dds. A los 14

La diferencia entre el mayor y el menor crecimiento de los micelios encontrados fue de 1,26 veces mayor en T5C y T3L, mientras que a los 21 dds fue de 1,30 veces mayor entre T6C y T1L (figura 4).

La investigación mostró que tanto la muestra de lindero (T5L, 23,6 mm) y centro (T6L, 24 mm) con el medio de desinfección solo agua destilada y el envés hacia abajo sobre gasa esteril, tuvieron los mayores promedios de crecimiento de los micelios (figura 4), manteniéndose esta tendencia desde los 7, 14 y 21 días, respectivamente.

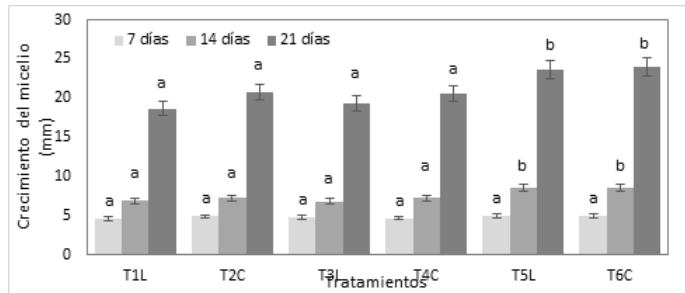


Figura 4. Crecimiento de micelios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, a los 7, 14 y 21 días por sitio de aplicación, obtenidos en el Laboratorio de la Universidad Técnica de Machala (Utmach).

Se destaca que en general el color de los micelios fue blanquecino y de aspecto esponjoso para todas las muestras, coincidiendo con lo que indicado por Adirano-Anaya, et al. (2018), al referir que los cultivos monospóricos de *M. fijiensis* en medio PDA colocados sobre papel filtro en cajas de Petri favorecieron la esporulación de los aislamientos y conservaron las características de crecimiento y virulencia del hongo, el tratamiento testigo presentó entre la primera y cuarta semana valores de 26,89 y 264,73 mm; mientras que Manzo, et al. (2018), indicaron que al evaluar la actividad fungica de extractos etanolicos, seleccionaron fragmentos de discos de 6 mm de diámetro de micelios de *M. fijiensis* de 21 días de edad cultivados en medio PDA + extractos etanólicos de propolio (eep) a 25 ± 2 °C, $75 \pm 5\%$ de humedad relativa, con 12 h luz/oscuridad, donde los periodos de evaluación mencionados, fueron establecidos debido a la particularidad de las colonias de *M. fijiensis*, los cuales presentaron crecimiento lento aproximadamente de 6,3 mm en 14 días.

Los micelios, los cuales poseen lento crecimiento (6.3 mm en 14 día

Los resultados obtenidos en el bioensayo de las muestras obtenidas en la Hacienda El Playón (figura 4) indicaron que los micelios mostraron un crecimiento lento, tanto para las muestras de los linderos como para las del centro, alcanzando en promedio 7,55 mm a los 14 días de incubación *in vitro*, concordando con lo reportado por Cuellar, et al. (2011), quienes mencionaron que los micelios en varias evaluaciones diarias, mostrarán crecimiento lento, alcanzando 6,3 mm aproximadamente en 14 días, en cuanto a la caracterización morfológica de las colonias

de *M. fijiensis*, estos micelios aislados a los 35 días de crecimiento en medio de cultivo PDA, conformaron tres grupos de colonias: grupo A: aislamiento con diámetro entre 13,83 a 16,33 mm (media del grupo 14,68 mm) con el 24%, grupo B: aislamientos con diámetro entre 12,00 a 13,82 mm (media del grupo 12,81 mm) 50% y grupo C: aislamientos de colonias con diámetro entre 9,50 a 11,99 mm (media del grupo 10,74 mm) con el 26%. Espinoza (2015), indicó que en la cámara de flujo laminar se seccionaron fragmentos de hojas de 3 x 3 mm, esterilizados por 5 minutos en etanol al 70%, luego por 8 minutos en hipoclorito de sodio al 1% y enjuagados con agua destilada, colocadas en papel filtro y ubicados en las cajas de Petri con el envés frente al medio de cultivo PDA para la descarga de ascosporas incubadas a 25 °C por un periodo de 15 días, para conseguir micelios de *M. fijiensis* para evaluar inhibición al usar fungicidas comerciales.

En este bioensayo quedó establecido, que a hasta los 21 dds, los micelios de *M. fijiensis*, obtenidos de muestras provenientes de la Hacienda banaera El Playón tanto del centro como de los linderos, en general presentarán un color blanquecinos y de aspecto esponjosos, conservando las mismas características en todas las muestras (cajas de Petri), coincidiendo con lo reportado por Adirano-Anaya, et al. (2018); además Sánchez, et al. (2018), demostraron que cultivos aislados de *M. fijiensis* en medio PDA a 25 ± 2 °C con luz constante, al emplear micelios monospóricos de 21 dds las colonias, conservando las características homogéneas en cuanto a velocidad de crecimiento, esto con el fin de disminuir el riesgo de datos erróneos. Mientras tanto, Manzo, et al. (2005) señalaron que al analizar las colonias provinientes de ascosporas cultivadas en medio PDA despues de 14 días de crecimiento a una temperatura de 26 °C y con un fotoperíodo de 12 h, estas presentaron un color gris-oscuro a blanco rosado, de forma esférica o con zonas irregulares y una consistencia algodonosa o compacta, dependiendo si las ascosporas procedieron de huertos con manejo rústico, semintensivo o intensivo. En otra investigación Bolaños, et al. (2012), obtuvieron aislamientos mono ascospóricos obtenidos a partir de tejidos de hojas de banano con SN, el micelio de *M. fijiensis* fue de color blanco y apariencia algodonosa, redonda y de crecimiento lento.

Según Manzo, Carrillo & Guzmán (2012), en su investigación sobre la sensibilidad *in vitro* del crecimiento de colonias de aislados de *M. fijiensis* creciendo en medio PDA y embebidos con fungicidas benomil, propiconazole, azoxistrobin, a la dosis letal recomendada, no debieron de generar crecimiento del hongo; sin embargo, los aislados de siete haciendas, mostraron sensibilidad a propiconazole a dosis de 1 ppm, para azoxystrobin nueve aislados crecieron a la dosis de 3 ppm y para 10 aislados con benomil a dosis de 10 ppm, estos fungicidas fueron aplicados solos y mostraron alta agresividad en campo.

CONCLUSIONES

La presente investigación demuestra que para garantizar una germinación de 93,33 a 100% de micelios de *M. fijiensis* in vitro los fragmentos de las hojas con SN, deben hacerse cortes de 1 cm², con estadio de mancha (6) y utilizar como medio de desinfección, solo agua destilada y gasa esteril por 1 minuto, en medio de cultivo PDA. Para obtener la germinación y crecimiento de los micelios *M. fijiensis*, se deben colocar a incubar por 21 dds a temperatura promedio de 27 °C ± 2°C, colocando los fragmentos de hojas en contenedores plásticos con capacidad de 500 mL y para garantizar la homogeneidad de los micelios, se debe repicar cortes de 1 cm² provenientes de un mismo sitio y mínimo tres repeticiones (cajas de Petri) por tratamiento.

La cámara de flujo laminar previamente debe ser esterilizada por 20 minutos para garantizar un cultivo axénico y tanto para fragmentos de hojas como de micelios germinados, se deben tomar con un escalpelo desinfectado con alcohol al 75% y la caja Petri con el medio de cultivo (PDA) se debe sellar inmediatamente con papel parafilm. Las muestras de hojas, para analizar el desarrollo y crecimiento de micelios en *M. fijiensis* in vitro, se deben recoger en sentido contrario al pase de avión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adirano-Anaya, M., Mejía-Ortiz, J., Ovando-Medina, I., Albores-Flores, V., & Salvador-Figueroa, M. (2018). Efecto de extractos alcohólicos de ajo (*Allium sativum*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) en el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(3), 379-393.
- Bolaños-Bolaños, L., Teliz-Ortiz, D., Rodríguez-Maciél, C., Mora-Aguilera, A., Nieto-Angel, D., Cortes-Flore, J., Mejía-Sánchez, D., Nava-Díaz, C., & Silva Aguayo, G. (2012). Resistencia a fungicidas en poblaciones de *Mycosphaerella Fijiensis* del sureste Mexicano. *Revista Agrociencia*, 46(7), 707-717.
- Cervantes Alava, A. R., Sánchez-Urdaneta, A. B., & Colmenares de Ortega, C. B. (2019). Efecto de las aplicaciones de fungicidas comerciales sobre el contenido de clorofila en el cultivo de banano (*Musa* AAA). *Revista Científica Agroecosistemas*, 7(3), 45-49.
- Cuellar, A., Álvarez, E., & Castaño, J. (2011). Evaluación de resistencia de genotipos de plátano y banano a la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijienses* Morelet). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(1), 5853-5865.
- Espinoza, J. (2015). Control químico y biológico de *Mycosphaerella* spp., del cultivo de banano en condiciones de laboratorio. (Tesis de grado). Universidad Técnica de Machala.
- Maiguashca, F. (2018). Pruebas de hoja simple con productos biorracionales, para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* var. Difformis), en el cultivo de banano *Musa acuminata* AAA. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Las Fuerzas Armadas.
- Manzo, G., Carrillo, H., & Guzmán, S. (2012). Análisis de la sensibilidad in vitro de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka Negra del banano a los fungicidas, Benomyl, Propiconazol y Azoxistrobin. *Revista mexicana de fitopatología*, 30(1), 81-85.
- Manzo, G., Guzman, S., Rodríguez, C., James, A., & Orozco, M. (2005). Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 87-96.
- Manzo, G., Sanchez, P., Chan, W., Silva, E., Sanchez, J., & Ayala, M. E. (2018). Actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleo contra *Mycosphaerella fijiensis*: un estudio in vitro. *Scientia Fungorum*, 47(1), 13-24.
- Pérez-Vicente, L. (2013). Manual on fungicides and fungicide resistance monitoring in banana. TCP-SLC-3402 Project-Development of Integrated Programmes and Action Plans for Black Sigatoka Disease Management in five countries of the Caribbean. <http://www.fao.org/3/a-as125e.pdf>
- Quevedo, J., Infantes, C., & García, R. (2018). Efecto del uso predominante de fungicidas sistémicos para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el área foliar del banano. *Revista Científica Agroecosistema*, 6(1), 128-136.
- Robinson, J., & Galán, V. (2012). *Plátanos y banano*. Eujoa Artes Gráficas.
- Sánchez, G., Pérez, R., Chan, W., Silva, E., Sánchez, J., y Ayala, M. (2018). Actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleo contra *Mycosphaerella fijiensis*: un estudio in vitro. *Scientia Fungorum*, 47(1), 13-24.
- Sepúlveda, L. (2016). Caracterización fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su relación con la sensibilidad a fungicidas en Colombia. *Revista Mexicana de Fitolpatol*, 34(1), 1-21.