



REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO**

FACULTAD DE POSGRADO

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

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

**BIOPROSPECCIÓN Y *SCREENING* DE
MICROORGANISMOS ENDÓFITOS
ANTAGONISTAS FRENTE A *XANTHOMONAS SP.* Y
*COLLETORICHUM SP.***

AUTORES:

**ANDRADE AVILA JOB JAMIL
ROMERO QUINTEROS IVÁN FRANCISCO**

DIRECTOR:

DR. SIMÓN PÉREZ MARTÍNEZ

MILAGRO, 2025

Derechos de Autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Nosotros, **Iván Francisco Romero Quinteros**, y **Job Jamil Andrade Ávila** en calidad de autores y titulares de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedemos los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de nuestro Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación tecnológica en Innovación tecnológica en el desarrollo de estrategias de biocontrol en el sector agrícola mediante el uso de microorganismos endófitos nativos. en conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedemos a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

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

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

Milagro, 20 de junio del 2025

Ing. Iván Francisco Romero Quinteros
C.I.: 0350141602

Ing. Job Jamil Andrade Ávila
C.I.: 0924883754

Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Simón Pérez Martínez**, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Iván Francisco Romero Quinteros** y **Job Jamil Andrade Ávila**, cuyo tema es **Bioprospección y *screening* de microorganismos endófitos antagonistas frente a *Xanthomonas sp.* y *Colletorichum sp.***, que aporta a la Línea de Investigación **Innovación tecnológica en el desarrollo de estrategias de biocontrol en el sector agrícola mediante el uso de microorganismos endófitos nativos.**, previo a la obtención del Grado **Magíster en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 20 de junio del 2025



Firmado electrónicamente por:
SIMÓN PÉREZ
MARTÍNEZ

Validar únicamente con FirmaEC

Simón Pérez Martínez

C.I.: 0960298784

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
ACTA DE SUSTENTACIÓN
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En la Facultad de Posgrado de la Universidad Estatal de Milagro, a los seis días del mes de agosto del dos mil veinticinco, siendo las 10:00 horas, de forma VIRTUAL comparece el/la maestrante, ING. ROMERO QUINTEROS IVAN FRANCISCO, a defender el Trabajo de Titulación denominado " **BIOPROSPECCIÓN Y "SCREENING" DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS ANTAGONISTAS FRENTE A "XANTHOMONAS SP." Y "COLLETORICHUM SP." "** ", ante el Tribunal de Calificación integrado por: Msc GARCES MONCAYO MARÍA FERNANDA, Presidente(a), SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID en calidad de Vocal; y, Ing. SANCHEZ VASQUEZ VIVIANA LORENA que actúa como Secretario/a.

Una vez defendido el trabajo de titulación; examinado por los integrantes del Tribunal de Calificación, escuchada la defensa y las preguntas formuladas sobre el contenido del mismo al maestrante compareciente, durante el tiempo reglamentario, obtuvo la calificación de: **96.33** equivalente a: **EXCELENTE**.

Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto el Tribunal de Calificación, siendo las 11:00 horas.



Firmado electrónicamente por:
MARIA FERNANDA
GARCES MONCAYO

Validar únicamente con Firm@CC

Msc GARCES MONCAYO MARÍA FERNANDA
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
JAIME DAVID SEVILLA
CARRASCO

Validar únicamente con Firm@CC

SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
VIVIANA LORENA
SANCHEZ VASQUEZ

Validar únicamente con Firm@CC

Ing. SANCHEZ VASQUEZ VIVIANA LORENA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
IVAN FRANCISCO
ROMERO QUINTEROS

Validar únicamente con Firm@CC

ING. ROMERO QUINTEROS IVAN FRANCISCO
MAGISTER

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
ACTA DE SUSTENTACIÓN
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

En la Facultad de Posgrado de la Universidad Estatal de Milagro, a los seis días del mes de agosto del dos mil veinticinco, siendo las 10:00 horas, de forma VIRTUAL comparece el/la maestrante, ING. ANDRADE AVILA JOB JAMIL, a defender el Trabajo de Titulación denominado " **BIOPROSPECCIÓN Y "SCREENING" DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS ANTAGONISTAS FRENTE A "XANTHOMONAS SP." Y "COLLETORICHUM SP."** ", ante el Tribunal de Calificación integrado por: Msc GARCES MONCAYO MARÍA FERNANDA, Presidente(a), SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID en calidad de Vocal; y, Ing. SANCHEZ VASQUEZ VIVIANA LORENA que actúa como Secretario/a.

Una vez defendido el trabajo de titulación; examinado por los integrantes del Tribunal de Calificación, escuchada la defensa y las preguntas formuladas sobre el contenido del mismo al maestrante compareciente, durante el tiempo reglamentario, obtuvo la calificación de: **97.00** equivalente a: **EXCELENTE**.

Para constancia de lo actuado firman en unidad de acto el Tribunal de Calificación, siendo las 11:00 horas.



Msc GARCES MONCAYO MARÍA FERNANDA
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID
VOCAL



Ing. SANCHEZ VASQUEZ VIVIANA LORENA
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL



ING. ANDRADE AVILA JOB JAMIL
MAGÍSTER

Dedicatoria

Para mi familia, mamá, papá, hermano, y mi querida abuela. A su lado, he encontrado la esencia del amor infinito, los cimientos fundamentales de mi vida.

Iván Romero.



Dedicatoria

Para Yamila y Ernesto, mis padres, cuyo inquebrantable amor, apoyo y sacrificios han nutrido mi corazón para seguir adelante y a mi querida novia.

Job Andrade.

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a Dios, por iluminar mi camino con sabiduría y darme la fortaleza necesaria para alcanzar este significativo logro académico. Agradezco con especial cariño a mi padre, por su constante apoyo y aliento a lo largo de mi formación profesional. Mi reconocimiento también está dirigido a mi colega, Job Andrade, cuya colaboración, compañerismo y esfuerzo compartido fueron esenciales para el desarrollo exitoso de esta investigación.

Extiendo mi gratitud al Ph.D. Simón Pérez Martínez, nuestro tutor, por su guía académica, orientación y compromiso con este proyecto. Asimismo, agradezco a los ingenieros Gabriel y Adriana de Bioseb Organics, por su valioso respaldo al brindarnos las instalaciones y recursos necesarios para la ejecución de los ensayos experimentales.

A todos ustedes, mi admiración y respeto. Que cada paso que emprendan los acerque a sus más altas metas y que el sendero del éxito esté siempre acompañado de perseverancia, dedicación y logros trascendentes.

Iván Romero

Agradecimientos

Expreso Expreso mi más profundo agradecimiento a mi familia, fuente constante de inspiración a lo largo de mi vida. Su paciencia, comprensión y amor incondicional han sido pilares fundamentales durante esta travesía académica, acompañándome en cada etapa del camino con firmeza y afecto.

Asimismo, extiendo un reconocimiento especial al doctor Simón Pérez Martínez, nuestro tutor y guía en esta investigación de maestría. Su orientación, sabiduría y dedicación han sido esenciales para mi formación profesional y personal. Agradezco profundamente su confianza, sus enseñanzas y el ejemplo que representa como académico y ser humano.

Finalmente, agradezco sinceramente al ingeniero Iván Romero, colega y amigo, por su apoyo constante, colaboración comprometida y compañerismo durante todo el proceso investigativo.

¡Mucho éxito a todos!

Job Andrade

Resumen

Esta investigación se centró en la significativa amenaza que representan los patógenos *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.*, causantes del tizón bacteriano y la antracnosis, respectivamente, los cuales pueden ocasionar pérdidas de rendimiento de hasta un 80% en variedades de cultivos susceptibles, un problema que se ve exacerbado por las crecientes limitaciones del control químico. Para abordar esta problemática, se llevó a cabo una bioprospección de endófitos a partir de 20 especies vegetales recolectadas en Ambato, Ecuador, evaluando la actividad antagonista in vitro de 133 aislados (81 bacterias y 52 hongos) frente a ambos patógenos. Un análisis de conglomerados posterior agrupó los aislados según su perfil de inhibición y las plantas en función de la similitud de sus comunidades endofíticas. Los resultados identificaron tres aislados con actividad superior: la bacteria BAC-25, aislada de *Rosmarinus officinalis*, demostró un amplio espectro de acción con halos de 10 mm contra *Xanthomonas* y 30 mm contra *Colletotrichum*; el hongo JOB-32, también de *R. officinalis*, exhibió una potente actividad antibacteriana con un halo de 20 mm frente a *Xanthomonas*; y el hongo JOB-25, aislado de *Thymus vulgaris*, mostró una fuerte inhibición antifúngica con 25 mm contra *Colletotrichum*. El análisis cinético confirmó la rápida fisiología de crecimiento de BAC-25, que alcanzó su máxima densidad celular ($\sim 3.0 \times 10^8$ cel/mL) en 24 a 48 horas, contrastando con los ciclos de producción más lentos y prolongados (hasta 96 horas) de los hongos JOB-20 y JOB-25. Este estudio subraya que la flora de Ambato es un valioso reservorio de endófitos con actividad antagonista específica y significativa, sentando una sólida base científica para el desarrollo de alternativas biológicas viables para el manejo de estas enfermedades agrícolas en el Ecuador.

Palabras clave: Bioprospección, Control biológico, Microorganismos endófitos, *Xanthomonas*, *Colletotrichum*, Antracnosis, Tizón bacteriano, Antagonismo microbiano, Actividad antimicrobiana, Ambato.

Abstract

This research focused on the significant threat posed by the pathogens *Xanthomonas sp.* and *Colletotrichum sp.*, which cause bacterial blight and anthracnose, respectively diseases capable of causing yield losses of up to 80% in highly susceptible crop varieties, a challenge further exacerbated by the increasing limitations of chemical control. To address this issue, a bioprospecting of endophytes was conducted from 20 plant species collected in Ambato, Ecuador, evaluating the in vitro antagonistic activity of 133 isolates (81 bacteria and 52 fungi) against both pathogens. A subsequent cluster analysis grouped the isolates based on their inhibition profiles and the host plants according to the similarity of their endophytic communities. The results identified three isolates with outstanding activity: BAC-25, a bacterium isolated from *Rosmarinus officinalis*, exhibited a broad spectrum of inhibition with halos of 10 mm against *Xanthomonas* and 30 mm against *Colletotrichum*; JOB-32, a fungal isolate from the same host, showed strong antibacterial activity with a 20 mm halo against *Xanthomonas*; and JOB-25, a fungus from *Thymus vulgaris*, displayed potent antifungal inhibition with a 25 mm halo against *Colletotrichum*. Kinetic analysis confirmed the rapid growth physiology of BAC-25, reaching peak cell density ($\sim 3.0 \times 10^8$ cells/mL) within 24 to 48 hours, in contrast to the slower and prolonged production cycles (up to 96 hours) observed in fungal isolates JOB-20 and JOB-25. This study highlights Ambato's native flora as a valuable reservoir of endophytes with specific and significant antagonistic activity, providing a robust scientific foundation for the development of viable biological alternatives to manage these agricultural diseases in Ecuador.

Keywords: Bioprospecting, Biological control, Endophytic microorganisms, *Xanthomonas*, *Colletotrichum*, Anthracnose, Bacterial blight, Microbial antagonism, Antimicrobial activity, Ambato.

Lista de Figuras

Figura 1: Ubicación de los sitios de recolección de muestras vegetales cercanas a la ciudad de Ambato, Ecuador. Fuente: Google Maps.	30
Figura 2: Etapas del procedimiento experimental de la investigación. Fuente: Autores.	31
Figura 3: Dendrograma de agrupamiento jerárquico (método de Ward, distancia euclidiana al cuadrado) que clasifica 20 especies vegetales según la similitud en la composición de sus endófitos aislados (hongos y bacterias). Fuente: Autores.	41
Figura 4: Abundancia total de microorganismos por hospedante. Fuente: Autores.	42
Figura 5: Riqueza total de microorganismos por hospedante. Fuente: Autores.	42
Figura 6: Agrupamiento bidireccional (Two-Way Cluster) y mapa de color (heatmap) de colonias bacterianas y sus características morfológicas, revelando dos grupos principales robustos A y B (100% en análisis de remuestreo (bootstrap) de 1000 iteraciones). Análisis de agrupamiento jerárquico utilizando el índice de similitud Gower y el método Complete Linkage. Software PAST 4. Fuente: Autores.	43
Figura 7: Agrupación bidireccional de aislados fúngicos endófitos y especies vegetales hospedantes de la ciudad de Ambato. Fuente: Autores.	45
Figura 8: Caracterización morfológica macro y microscópica del hongo JOB 25. Fuente: Autores.	47
Figura 9: Caracterización morfológica macro y microscópica del hongo JOB 20. Fuente: Autores.	47
Figura 10: Caracterización morfológica macro y microscópica de la bacteria gran negativa BAC-25. Fuente: Autores.	48
Figura 11: Agrupamiento bidireccional y mapa de color de aislados bacterianos endófitos y su capacidad antagónica (halo de inhibición en mm) frente a aislados de <i>Colletotrichum</i> sp. y de <i>Xanthomonas</i> sp. Software PAST 4.	49
Figura 12: Top diez hospedantes por antagonismo promedio total. Fuente Autores.	51
Figura 13: Curva de crecimiento del aislado BAC-25, ajustada mediante un polinomio de grado 3. Fuente: Autores.	52
Figura 14: Curva de crecimiento del aislado fúngico JOB-20 durante 168 horas de cultivo. Fuente: Autores.	53
Figura 15: Curva de crecimiento del aislado fúngico JOB-25. Fuente: Autores.	55

Lista de Tablas

<i>Tabla 1: Operacionalización de variables. Fuente: Autores.</i>	9
<i>Tabla 2: Especies vegetales hospedantes seleccionadas para el aislamiento de microorganismos endófitos.</i> <i>Fuente: Autores.</i>	32

Índice

Resumen	8
Abstract	9
Lista de Figuras	1
Lista de Tablas.....	1
Índice	2
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación	3
1.1. Planteamiento del Problema	3
1.2. Delimitación del Problema.....	5
1.3. Formulación del Problema	5
1.4. Preguntas de Investigación	6
1.5. Objetivos.....	6
1.5.1. Objetivo General.....	6
1.5.2. Objetivos Específicos.....	6
1.6 Hipótesis	7
1.7. Justificación.....	7
1.8 Declaración de las variables (Operacionalización)	8
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial	10
2.1 Antecedentes Referenciales	10
2.1.1 Introducción al complejo patológico en Ecuador	10
2.1.2 Panorama de <i>Colletotrichum</i> en el Ecuador	11
2.1.3 Panorama de <i>Xanthomonas</i> en el Ecuador.....	12
2.1.4 Panorama de <i>Candidatus Liberibacter</i> en el Ecuador	13
2.2 Marco Conceptual.....	15
2.2.1 Definición de microorganismos endófitos	15
2.2.2 Métodos de aislamiento y caracterización de endófitos.....	18
2.2.3 Ensayos de actividad antagonista in vitro.....	20
2.3 Marco Teórico.....	21
2.3.1 Fitopatógenos de Relevancia Económica en Ecuador:	21
2.3.3 Mecanismos de acción de los endófitos	22
2.4 El género <i>Colletotrichum</i> y la antracnosis en frutales andinos	23
2.5 El género <i>Xanthomonas</i> y su repercusión agronómica	25
2.7 El complejo patológico <i>Bactericera cockerelli</i> – <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>	26

2.8 Limitaciones del manejo convencional de plagas	27
2.8.1 Dependencia de insecticidas químicos	27
2.9 Posicionamiento conceptual de la investigación	28
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico.....	29
3.1 Sitio de muestreo y colecta de muestras vegetales	29
3.2 Aislamiento y purificación de bacterias y hongos endófitos	33
3.3 Caracterización morfológica y bioquímica.....	34
3.3.1 Descripción de aislados fúngicos	35
3.4 <i>Screening</i> para la actividad antimicrobiana mediante enfrentamiento de colonias	36
3.5 Detección de metabolitos antimicrobianos en extractos crudos de aislados promisorios	37
3.6 Análisis de datos	39
CAPÍTULO IV: Resultados	41
4.1 Diversidad Morfológica de la Comunidad Endofítica	45
4.1.1 Riqueza y Abundancia de Endófitos Aislados.....	46
4.1.2 Caracterización Morfológica	46
4.2 Actividad Antimicrobiana a priori	48
4.2.1 Actividad Antagonista de los aislados bacterianos frente a <i>Xanthomonas sp</i> y <i>Colletotrichum sp.</i>	48
4.2.2 Actividad Antagonista de los aislados fúngicos frente a <i>Xanthomonas sp</i> y <i>Colletotrichum sp.</i>	50
4.3 Cinética de producción de metabolitos en aislados promisorios	51
CAPÍTULO V: Discusión, Conclusiones y Recomendaciones	56
5.1 Discusión.....	56
5.2 Conclusiones	59
5.3 Recomendaciones	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

Introducción

Las enfermedades de las plantas representan una amenaza constante para la producción agrícola a nivel mundial, impactando directamente la seguridad alimentaria y la economía de diversas regiones. Entre el amplio espectro de agentes patógenos, los géneros bacterianos *Xanthomonas* y los fúngicos *Colletotrichum* destacan por su extensa distribución, la diversidad de especies vegetales que afectan y las significativas pérdidas que ocasionan en cultivos de gran importancia económica (Guha & Mandal, 2024). Por ello, la comprensión profunda de su biología y sus estrategias de patogenicidad es fundamental para desarrollar métodos de control eficaces y sostenibles.

En el caso del género *Xanthomonas*, este agrupa a bacterias Gram negativas con forma de bastón, aerobias obligadas y generalmente pigmentadas de amarillo, que presentan un desarrollo óptimo en un rango de temperatura de 25 a 30°C, estos microorganismos son responsables de enfermedades graves en cerca de 400 especies de plantas, afectando cultivos vitales como el arroz, los cítricos, la col y el pimiento, el ciclo de infección de *Xanthomonas* inicia con una fase epífita, donde las bacterias colonizan las superficies de hojas y frutos, para luego pasar a una fase endofítica al ingresar al hospedero a través de heridas o hidatodos (Nakayinga et al., 2021). Una vez en el interior, se propagan sistémicamente o colonizan el mesófilo, para finalmente reemerger a la superficie y ser dispersadas por el viento y la lluvia hacia nuevos hospederos.

Otros elementos cruciales para su supervivencia y patogenicidad incluyen los polisacáridos extracelulares como la goma xantana, que es clave en la formación de biofilms, y los lipopolisacáridos de su membrana externa, que protegen a la bacteria y participan en el reconocimiento del hospedero (Insuasti et al., 2022).

Paralelamente, las especies del género *Colletotrichum* son los agentes causales predominantes de la antracnosis, una enfermedad caracterizada por la aparición de lesiones necróticas hundidas y confluentes en el follaje y otros tejidos vegetales (Shi et al., 2021).

Especies como *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. graminicola* son responsables de daños devastadores en una amplia gama de cultivos, en el mango, la antracnosis es la enfermedad más grave en regiones de alta pluviosidad, manifestándose como manchas oscuras en el fruto durante su maduración (Valle et al., 2022). En banano y guayaba, es considerada la enfermedad más destructiva en los trópicos, causando manchas negras hundidas en la cáscara del fruto maduro, asimismo, la antracnosis del altramuz, causada por *C. gloeosporioides*, es la enfermedad más importante para este cultivo a nivel mundial y puede ocasionar pérdidas de rendimiento de grano de hasta un 50%, e incluso un 80% en variedades muy susceptibles (Dofuor et al., 2023).

Los endófitos, que habitan los tejidos internos de las plantas sin causar daño aparente, pueden proteger a su hospedante mediante la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana o la inducción de sus defensas sistémicas (Acaro & Cevallos, 2025).

El diseño teórico de esta investigación se basa en el principio del antagonismo microbiano, metodológicamente, se realizará el aislamiento de la microbiota endofítica de veinte especies vegetales locales, seguido de un cribado in vitro para evaluar su capacidad antagonista frente a *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.* La elección de *Xanthomonas* como modelo bacteriano se justifica por su relevancia agrícola y también por la vasta base de conocimiento sobre sus mecanismos de virulencia, lo que ofrece un sistema robusto para evaluar interacciones antagónicas, el entendimiento de estos mecanismos podría, además, ofrecer perspectivas para estudiar patógenos más complejos como *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso).

Por lo tanto, la investigación busca responder a la pregunta: ¿Qué microorganismos endófitos aislados de la flora de la región de Ambato poseen la capacidad de inhibir in vitro el crecimiento de fitopatógenos bacterianos (*Xanthomonas sp.*) y fúngicos (*Colletotrichum sp.*) de importancia agrícola?

Para una planificación clara y sistemática, el presente documento se estructura en cinco capítulos. El Capítulo I detalla el planteamiento del problema, los objetivos y la justificación de la investigación. El Capítulo II presenta el marco teórico que sustenta el estudio. El Capítulo III describe en detalle el diseño metodológico implementado para el aislamiento y la evaluación de los microorganismos. El Capítulo IV expone el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo. Finalmente, el Capítulo V ofrece la discusión de los hallazgos, junto con las conclusiones y recomendaciones que se derivan del estudio.

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

1.1. Planteamiento del Problema

La agricultura contemporánea se enfrenta a una compleja red de desafíos fitosanitarios que comprometen la productividad, la calidad y la sostenibilidad de los sistemas de cultivo a escala global. Dentro de este contexto, la presencia de fitopatógenos bacterianos y fúngicos, específicamente *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.*, constituye una amenaza persistente. Estos agentes etiológicos son responsables del tizón bacteriano y la antracnosis, respectivamente, enfermedades que pueden inducir pérdidas de rendimiento de grano de hasta un 80% en variedades de alta susceptibilidad.

En este escenario, la investigación se focalizó en el potencial de los microorganismos endófitos, aquellos que establecen asociaciones simbióticas o mutualistas colonizando los tejidos internos de las plantas sin generar sintomatología patogénica, estos m.o son reconocidos por su capacidad de biosintetizar una amplia gama de metabolitos secundarios con propiedades

antifúngicas, antibacterianas o insecticidas, diversos estudios han elucidado cómo los endófitos contribuyen al biocontrol de patógenos y plagas, promoviendo el crecimiento vegetal, lo que les confiere una funcionalidad dual con considerable potencial biotecnológico (Bratcher, 2021).

Seguidamente, la prospección y caracterización de la microbiota endofítica de la región Interandina emerge como una línea de investigación prioritaria para la concepción e implementación de herramientas innovadoras en el manejo integrado de plagas y enfermedades. Asociado a esta problemática intrínseca, la provincia de Tungurahua, Ecuador, enfrenta una preocupación adicional derivada de la confirmación de la presencia de *Bactericera cockerelli* (Manobanda et al., 2022).

Este psílido es un vector altamente eficiente de la bacteria Gram negativa *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso), el agente causal de enfermedades devastadoras en cultivos de relevancia económica como *Solanum lycopersicum* L. (tomate), *Solanum tuberosum* L. (papa) y *Capsicum annuum* L. (pimiento) (Hernández et al., 2019). Las plantas infectadas por la interacción *B. cockerelli*-Lso manifiestan síntomas fisiopatológicos severos, incluyendo amarillamiento foliar generalizado, acortamiento de entrenudos, deformaciones foliares y un notable achaparramiento, lo que culmina en una reducción drástica de la productividad agrícola (Roque et al., 2024).

Históricamente, el control de *B. cockerelli* en la región ha dependido de la aplicación intensiva de agroquímicos, no obstante, esta estrategia, si bien ofrece un control temporal, presenta desventajas inherentes: elevados costos operativos, una eficacia comprometida por la rápida evolución de resistencia en las poblaciones del insecto y considerables impactos ecotoxicológicos y riesgos para la salud humana asociados a la exposición a residuos químicos (Mora et al., 2021). La concatenación de estas limitaciones, tanto las impuestas por patógenos

directos como por complejos vector-patógeno, recalca la necesidad de explorar y desarrollar estrategias de manejo fitosanitario alternativas, que sean más sostenibles y eficaces.

1.2. Delimitación del Problema

El presente estudio se enfocó en el aislamiento y la evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de microorganismos endófitos, las muestras biológicas se obtuvieron de especies vegetales sanas recolectadas en la provincia de Tungurahua, Ecuador, específicamente en la ciudad de Ambato y sus alrededores. La evaluación de la actividad antagonista se realizó utilizando como organismos modelo una bacteria del género *Xanthomonas* y el hongo fitopatógeno *Colletotrichum sp.* La investigación se limitará a condiciones de laboratorio en su etapa inicial, sin abordar la evaluación en campo.

1.3. Formulación del Problema

La capacidad de los microorganismos endófitos para controlar patógenos vegetales emerge como una solución prometedora que merece una exploración profunda, la identificación de endófitos con alta capacidad inhibitoria in vitro contra patógenos modelos como *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.* abordaría estas problemáticas directas, y sentaría las bases para futuras investigaciones con la potencial aplicación de estos agentes de biocontrol contra otras amenazas complejas, incluyendo vectores de enfermedades transmitidas por insectos, como la paratarioza, y sus patógenos asociados.

Por consiguiente, la pregunta de investigación específica que abordará esta tesis es: ¿En qué especies vegetales de la región de Ambato se pueden aislar microorganismos endófitos con capacidad para inhibir in vitro el crecimiento de una bacteria Gram negativa del género *Xanthomonas sp.* y del hongo fitopatógeno *Colletotrichum sp.*?

1.4. Preguntas de Investigación

1. ¿Qué microorganismos endófitos (hongos y bacterias) pueden ser aislados de tejidos (hojas, tallos) de especies vegetales sanas recolectadas en la región de Ambato, provincia de Tungurahua?
2. ¿Cuál es la diversidad morfológica de los microorganismos endófitos aislados, determinada mediante caracterización macroscópica y microscópica?
3. ¿Exhiben los extractos crudos de los microorganismos endófitos aislados actividad inhibitoria in vitro contra una bacteria Gram negativa del género *Xanthomonas* y el hongo fitopatógeno *Colletotrichum sp.*, evaluada mediante ensayos de confrontación dual?

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Evaluar el potencial antagonista in vitro de microorganismos endófitos aislados de especies vegetales sanas de la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, frente a una bacteria Gram negativa del género *Xanthomonas* y el hongo fitopatógeno *Colletotrichum sp.*

1.5.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar morfológicamente microorganismos endófitos (hongos y bacterias) presentes en tejidos (hojas y tallos) de especies vegetales sanas recolectadas en la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua.
2. Evaluar in vitro la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de los microorganismos endófitos aislados contra una bacteria Gram negativa del género *Xanthomonas* y el hongo fitopatógeno *Colletotrichum sp.*, mediante ensayos de confrontación dual.

3. Seleccionar los microorganismos endófitos que exhiban la mayor capacidad inhibitoria in vitro contra los patógenos modelos evaluados.

1.6 Hipótesis

Los microorganismos endófitos aislados de diversas especies vegetales de la flora de la región de Ambato, Ecuador, poseen la capacidad de exhibir actividad antagonica in vitro significativa contra los fitopatógenos *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.*

1.7. Justificación

El presente estudio se justifica por su enfoque en la exploración de los recursos microbianos endófitos presentes en la biodiversidad vegetal de Ambato, como una estrategia para mitigar los efectos de patógenos relevantes en la agricultura local. La identificación de endófitos con actividad antagonista in vitro contra modelos como *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.* podría sentar las bases para el desarrollo futuro de biopreparados que contribuirían a un manejo más integrado y sostenible de enfermedades en cultivos clave, reduciendo la dependencia de agroquímicos sintéticos y promoviendo prácticas agrícolas más resilientes.

Además, la caracterización de estos microorganismos y sus mecanismos de acción puede generar conocimiento científico valioso con aplicaciones potenciales en la agricultura y otros campos biotecnológicos, al mismo tiempo, la justificación de esta investigación radica en la urgente necesidad de desarrollar estrategias de manejo fitosanitario que sean tanto sostenibles como eficaces, una necesidad evidenciada por la problemática de enfermedades transmitidas por vectores como *Bactericera cockerelli* en cultivos de alta importancia para la región de Ambato.

Los métodos de control químico tradicionales, que han sido la principal respuesta, presentan limitaciones significativas en términos de costos, desarrollo de resistencia y efectos

adversos para el medio ambiente y la salud humana (Enriquez et al., 2024). Frente a este panorama, la investigación sobre microorganismos endófitos ofrece una vía prometedora para el desarrollo de alternativas biológicas. Estos microorganismos, al residir de manera asintomática dentro de los tejidos vegetales, pueden producir una amplia gama de compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana, lo que los convierte en una fuente potencial de agentes de control biológico innovadores y respetuosos con el entorno.

1.8 Declaración de las variables (Operacionalización)

La operacionalización de esta variable se realizó mediante el registro, purificación y caracterización morfológica de los aislados provenientes de 20 especies vegetales, con el objetivo de clasificar los distintos morfotipos obtenidos. Dicha caracterización incluyó descriptores macroscópicos como color, textura, forma y margen de las colonias, así como parámetros microscópicos como tinción de Gram, morfología celular, tipo de micelio y esporulación. Se cuantificó además la abundancia relativa de cada morfotipo.

Para el análisis estadístico, las variables cualitativas fueron codificadas numéricamente: por ejemplo, el margen como rizoide (1) u ondulado (2), y la superficie como rugosa (1) o lisa (2). Esta matriz codificada fue analizada mediante técnicas de conglomerados para identificar grupos con similitudes morfológicas y funcionales. En los hongos se aplicó una codificación similar, asignando valores como esponjosa (1) o lisa (2) a la textura, y utilizando la escala de colores del British Standard 381C:1996 tanto para el color de la colonia como del sustrato, además, el pigmento entendido como el metabolito visible en el medio de cultivo se codificó como ausente (0) o presente (1). Por ejemplo, en el aislado JOB-20, se asignaron los valores 1 para el color Golden yellow (BS381C 356) de la colonia y 7 para el Light Brunswick green (BS381C 225) del reverso de la placa. Las variables empleadas en la investigación se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Operacionalización de variables. Fuente: Autores.

Tipo de Variable	Descripción	Dimensión	Indicadores / Medición (Medio de Cultivo)
Independiente	Bacterias y hongos que colonizan los tejidos internos de plantas sanas sin causar enfermedad.	Origen, Tipo, Cantidad de Aislados	Origen: 20 especies vegetales de la flora de Ambato, Ecuador- Tipo: Bacterias (81 aislados), Hongos (52 aislados)
	Rasgos culturales, macroscópicos y microscópicos de las colonias aisladas.	Identificación y Clasificación	Bacterias: Forma, margen, elevación, superficie, brillo, textura, color (BS 381C:1988), Tinción de Gram, morfología celular (evaluado en Agar Nutriente - AN)- Hongos: Color anverso/reverso, producción de pigmentos, textura, micelio, estructuras reproductivas, esporulación (evaluado en Agar Papa Dextrosa - PDA)
Dependiente	Capacidad de los endófitos para inhibir el crecimiento de fitopatógenos.	Potencial Antagonista	Inhibición de <i>Xanthomonas sp.</i> : Diámetro del halo de inhibición (mm) (evaluado en Agar Nutriente - NA)- Inhibición de <i>Colletotrichum sp.</i> : Diámetro del halo de inhibición (mm) (evaluado en Agar Papa Dextrosa - PDA)- Aislados Elite: BAC-25, JOB-32, JOB-25
	Patrones temporales de crecimiento y producción de metabolitos de aislados seleccionados.	Optimización de la Producción	Tasa de crecimiento: Concentración celular (UFC/mL o cél/mL) a intervalos de tiempo (24, 48, 72, 96, 120, 168, 240 horas)- Medios de Cultivo: Medio Mínimo para Hongos (MMF) para hongos (JOB-20, JOB-25); Medio estéril (Extracto de Levadura, K ₂ HPO ₄ , sales, melaza) para bacterias (BAC-25)
Contexto de Muestreo	Localización geográfica de la recolección de muestras vegetales.	Ubicación Geográfica	Zonas agrícolas y agroecosistemas en Ambato, Tungurahua, Ecuador (coordenadas: 1.2215081656311217, -78.57504647630647)

CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

2.1 Antecedentes Referenciales

2.1.1 Introducción al complejo patológico en Ecuador

El género *Colletotrichum* (*Sordariomycetes*, *Ascomycota*) comprende un gran número de fitopatógenos fungosos que causan la enfermedad de la antracnosis en una amplia variedad de cultivos tropicales y no tropicales en todo el mundo (Hernández et al., 2019). La antracnosis es una de las enfermedades más importantes en la producción agrícola global, ya que puede provocar pérdidas significativas, oscilando entre el 50% y el 100% en cultivos de importancia económica, incluyendo árboles frutales, vegetales y plantas ornamentales, esta enfermedad se caracteriza por la formación de lesiones hundidas de color negro a marrón oscuro en la superficie de los frutos y otras partes de la planta, lo que reduce drásticamente la calidad y comerciabilidad de los productos (Guevara et al., 2022).

La taxonomía de *Colletotrichum* ha experimentado revisiones recientes, basándose en un enfoque polifásico que incluye la evaluación de caracteres morfológicos y análisis de secuencias multi-locus de marcadores moleculares como la región ITS (espaciador transcrito interno) del ADNr, β -tubulina (TUB), actina (ACT), calmodulina (CAL), quitina sintasa I (CHS-1), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la subunidad grande de la ARN polimerasa II (RPB2) y el factor de elongación de la traducción 1- α (EF1 α) (Dofuor et al., 2023). Anteriormente, muchas de las especies causantes de antracnosis eran referidas comúnmente como *Colletotrichum gloeosporioides* o *Colletotrichum acutatum*, pero los análisis filogenéticos recientes han revelado que estas especies pertenecen a complejos con múltiples otras especies incluidas (Peralta et al., 2023).

2.1.2 Panorama de *Colletotrichum* en el Ecuador

En la región norte de Sudamérica, que incluye Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela, las especies de *Colletotrichum* afectan numerosos cultivos tropicales de alta importancia económica. Sin embargo, los estudios sobre la identificación molecular de especies de *Colletotrichum* en Ecuador, Perú y Venezuela han sido históricamente limitados, con menos investigaciones realizadas en comparación con Colombia (Guevara et al., 2022). A pesar de esta limitación, las investigaciones disponibles indican que las especies de *Colletotrichum* en esta subregión se distribuyen principalmente en cinco complejos de especies: *acutatum*, *boninense*, *gigasporum*, *gloeosporioides* y *orbiculare*, siendo la mayoría de las especies observadas en el clado *gloeosporioides* (Tan et al., 2023).

En Ecuador, se han reportado seis estudios que identifican especies de *Colletotrichum* asociadas a cultivos. Entre las especies y complejos identificados en el país se incluyen *C. acutatum*, así como *C. gloeosporioides* del complejo *gloeosporioides*, ha sido identificado como agente causal de antracnosis en banano (*Musa spp.*), mientras que *Colletotrichum tamarilloi* se ha aislado como responsable de esta enfermedad en tomate de árbol, especialmente en las tierras altas del país (Rodríguez et al., 2023).

Cultivos importantes en Ecuador afectados por estas especies incluyen el tomate de árbol (*Solanum betaceum*), plátano (*Musa spp.*), mora andina (*Rubus glaucus*) y lupino (*Lupinus mutabilis*) (Hammond et al., 2023). Es importante destacar que *C. lindemuthianum* también ha sido reportado en frijol (*Phaseolus vulgaris*) en Ecuador, y *C. gigasporum* ha sido aislado en Colombia como un hongo endófito de *Coffea arabica*, con una distribución geográfica aparentemente amplia. Por otro lado, *Colletotrichum acutatum* ha sido vinculado a infecciones en lupino (*Lupinus mutabilis*) y en tomate de árbol, mostrando una clara especialización por ciertos hospedadores.

2.1.3 Panorama de *Xanthomonas* en el Ecuador

Las enfermedades bacterianas representan una amenaza significativa para la producción de banano, un cultivo esencial para la seguridad alimentaria y la economía de pequeños agricultores en regiones tropicales y subtropicales. Estas enfermedades pueden provocar pérdidas sustanciales, alcanzando hasta el 100 % del rendimiento en algunos casos, uno de los patógenos más destructivos es *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Xcm), causante del Marchitamiento Bacteriano del Banano, la infección puede aniquilar plantaciones enteras, generando pérdidas económicas severas y poniendo en riesgo los medios de vida de miles de agricultores (Acaro & Cevallos, 2025).

El desarrollo de cultivares resistentes mediante métodos tradicionales de mejoramiento es complejo debido a factores como la poliploidía, la esterilidad de muchos cultivares comerciales, el largo ciclo productivo del banano y la limitada variabilidad genética del germoplasma disponible (Mendoza et al., 2025). Las prácticas fitosanitarias, como el uso de material de siembra libre de contaminación y la desinfección de herramientas agrícolas, son consideradas medidas preventivas fundamentales. Sin embargo, su implementación suele ser laboriosa e inconsistente, lo que reduce su efectividad en condiciones reales de campo.

Ante estos obstáculos, han surgido herramientas biotecnológicas modernas que ofrecen alternativas prometedoras, entre ellas destacan técnicas como la transgénesis y, más recientemente, la edición genómica. Esta última, especialmente mediante el uso de CRISPR/Cas9, representa una tecnología emergente con un gran potencial para acelerar el desarrollo de resistencia a enfermedades en cultivos tan demandantes como el banano. En años recientes se ha logrado avances significativos en la creación de líneas de banano resistentes a patógenos bacterianos utilizando edición genética (Tripathi et al., 2022). En América Latina, incluido Ecuador, se observa una evolución progresiva en las regulaciones relacionadas con la

edición genética, orientada a equilibrar la promoción de la innovación con criterios de seguridad y armonización internacional. No obstante, en el país aún se requiere mayor investigación y análisis para establecer directrices claras y actualizadas sobre el uso de estas tecnologías en el sector agrícola.

2.1.4 Panorama de *Candidatus Liberibacter* en el Ecuador

La propagación de *Bactericera cockerelli* y *Candidatus Liberibacter solanacearum* ha experimentado un incremento global en las últimas décadas, impactando gravemente cultivos en América, Oceanía y, más recientemente, en Latinoamérica. En Ecuador, la detección inicial de *B. cockerelli* se registró a finales de 2017 en plantaciones de papa en Pichincha. Posteriormente, en 2019, se confirmó molecularmente el haplotipo A de CLso en papas enfermas, lo que evidencia el establecimiento de este complejo patológico en regiones productoras clave como Tungurahua y Cotopaxi, y posiciona a la agricultura local en un estado de alta vulnerabilidad, especialmente para las solanáceas (Roque et al., 2024).

B. cockerelli funciona como vector de CLso, una bacteria filamentososa asociada con la devastadora enfermedad *zebra chip* en papa (*Solanum tuberosum*) y el enrollado vascular en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Mora et al., 2021). A nivel nacional, los estudios se han enfocado en la detección molecular de CLso en papa y en la caracterización parcial de síntomas (amarillamiento, *zebra chip*, enrollado foliar) en parcelas comerciales (Mora et al., 2021). Sin embargo, aún persiste un vacío de conocimiento en la caracterización integral de la dinámica vector-patógeno-hospedante en los cultivos locales. Esta brecha justifica la necesidad imperante de desarrollar estrategias de control alternativas que integren no solo aspectos químicos, sino también biológicos y de manejo (Pedraza et al., 2022). Ambas patologías, tanto la asociada con CLso como otras fitopatologías, provocan una reducción sustancial del rendimiento y la calidad, manifestándose a través de clorosis, necrosis y estriaciones oscuras

en el tejido vascular de la papa, además de deformaciones en hojas y frutos, lo que resulta en pérdidas económicas significativas para la industria de procesamiento y consumo de tubérculos y hortalizas solanáceas (Wenninger & Rashed, 2024).

Estudios recientes sobre la biología del vector y la diversidad de CLso, incluyendo trabajos de transcriptómica en *B. cockerelli*, han identificado genes diferencialmente activados por la presencia de CLso en glándulas salivales y ovarios. Esto ha revelado mecanismos moleculares clave en la transmisión y patogénesis del complejo vector-bacteria en las plantas hospedantes. Además, se han descrito múltiples haplotipos de CLso (A, B, C, D, E, F, H, etc.) asociados con hospedantes en *Solanaceae* y *Apiaceae*, todos transmitidos por diferentes especies de psílidos. Esta diversidad resalta la complejidad epidemiológica del patosistema y enfatiza la eficiencia de *B. cockerelli* como vector principal de CLso en diversas regiones (Roque et al., 2024).

Paralelamente, la presencia de otros patógenos bacterianos y fúngicos, como los mencionados en esta investigación, representa una amenaza significativa para la agricultura ecuatoriana. Un ejemplo notorio es *Ralstonia solanacearum*, la bacteria causante del Moko en banano, cuya presencia ya está documentada en el país. Esta enfermedad induce síntomas como marchitamiento foliar y deterioro progresivo del fruto, habiéndose asociado con pérdidas totales en algunas plantaciones de América Latina, incluyendo registros en Colombia. Adicionalmente, se han documentado casos de pudrición poscosecha en mora andina (*Rubus glaucus*) atribuidos a especies de *Colletotrichum*, patógeno que también afecta al tomate. Esto sugiere una amplia capacidad de dispersión de estos hongos y una variedad de interacciones ecológicas con diferentes cultivos en el territorio ecuatoriano (Mendoza et al., 2025).

2.2 Marco Conceptual

Esta sección define los conceptos y variables claves empleados en la investigación, así como los métodos teóricos y empíricos utilizados para operacionalizarlos.

2.2.1 Definición de microorganismos endófitos

Los microorganismos endófitos son bacterias y hongos que colonizan los tejidos internos de las plantas como hojas, tallos, raíces, semillas, flores y frutos sin inducir síntomas visibles de enfermedad en la planta hospedadora, estas comunidades microbianas pueden establecerse en espacios intracelulares o extracelulares, formando relaciones simbióticas que van desde el comensalismo hasta el mutualismo, se ha documentado su presencia en una amplia diversidad de especies vegetales distribuidas en múltiples ecosistemas, lo cual sugiere que prácticamente todas las plantas terrestres albergan uno o más tipos de microorganismos endófitos (Shi et al., 2021).

Estos organismos han generado un interés creciente en los últimos años debido a su capacidad para sintetizar metabolitos secundarios con propiedades bioactivas, incluyendo compuestos antimicrobianos, antifúngicos, insecticidas y anticancerígenos, lo que los convierte en candidatos prometedores para aplicaciones en agricultura sostenible, biotecnología y medicina.

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que estos m.o pueden contribuir al crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas, la solubilización de nutrientes y la mejora en la absorción de elementos esenciales, también participan activamente en la defensa de la planta frente a agentes patógenos y condiciones adversas del entorno, ya sea mediante la inducción de mecanismos de resistencia sistémica (IRS) o la síntesis de metabolitos protectores, tales como compuestos volátiles, enzimas líticas y péptidos antimicrobianos (Reis et al., 2022).

Se han realizado investigaciones enfocadas en el género *Rumex*, conocido por su riqueza en metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas relevantes, como antraquinonas, flavonoides, terpenos y estilbenoides, estas especies vegetales han sido ampliamente estudiadas por sus efectos anticancerígenos, antimicrobianos, antidiabéticos, antioxidantes y actividades inhibitorias de la colinesterasa, sin embargo, uno de los aspectos menos explorados es la riqueza y diversidad de los microorganismos endófitos asociados a estas plantas, cuyo rol potencial en la defensa vegetal y en la síntesis de compuestos bioactivos aún no se comprende completamente (Ntemafack et al., 2023).

Aunque ya se han realizado algunos estudios sobre endófitos en ciertas especies de plantas su diversidad microbiana interna sigue siendo escasamente conocida en comparación con la riqueza química del propio hospedador.

El artículo de Ntemafack et al., (2023), proporciona una base sólida para futuras investigaciones orientadas al aislamiento, caracterización y aplicación biotecnológica de endófitos en *Rumex*, con énfasis en su habilidad para generar compuestos bioactivos novedosos que sirven como método explicativo.

Además de su relevancia agrícola, los microorganismos endófitos también emergen como fuentes prometedoras de nuevos compuestos bioactivos con aplicaciones en salud humana. Las biomoléculas derivadas de hongos y bacterias endófitos representan candidatos viables para el desarrollo de agentes anticancerígenos, antipalúdicos, antituberculosos, antivirales y antiinflamatorios (Insuasti et al., 2022).

Dada la creciente resistencia a los tratamientos existentes, existe una urgente necesidad de descubrir nuevos compuestos capaces de superar estas limitaciones, los endófitos se consideran una fuente poco explotada de metabolitos con alto potencial terapéutico, lo que los

convierte en aliados estratégicos en la búsqueda de nuevas moléculas farmacológicamente activas (Pedraza et al., 2022).

Entre los metabolitos secundarios reportados se encuentran alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanos, saponinas, terpenos, quinonas y xantonas, entre otros compuestos de interés (Singh & Kumar, 2023). No obstante, el estudio de la diversidad y del potencial funcional de los endófitos enfrenta varios desafíos metodológicos que pueden influir significativamente en los resultados obtenidos.

Investigadores mencionan que uno de los factores críticos es la esterilización superficial del tejido vegetal utilizado para el aislamiento, si este proceso no se realiza adecuadamente, puede ocurrir que la microbiota epifítica no sea eliminada por completo, generando contaminaciones que interfieran con el análisis real de la comunidad endofítica, por otro lado, un tratamiento excesivo podría afectar negativamente la viabilidad de los microorganismos residentes, alterando la composición natural de la comunidad fúngica o bacteriana presente (Reis et al., 2022).

Un punto fundamental corresponde a la elección del medio de cultivo y las condiciones ambientales empleadas durante el proceso de aislamiento. Algunos medios favorecen selectivamente ciertos grupos microbianos mientras inhiben otros, lo que puede resultar en una subestimación de la diversidad real. Asimismo, errores en la identificación taxonómica del organismo pueden llevar a interpretaciones incorrectas sobre su potencial biosintético o funcional (Reis et al., 2022). Estas limitaciones, presentes desde las etapas iniciales del trabajo experimental hasta el análisis final, resaltan la importancia de adoptar protocolos estandarizados y cuidadosamente validados.

La selección adecuada de técnicas de aislamiento, caracterización morfológica y molecular, así como métodos de evaluación de actividad biológica, es fundamental para

obtener resultados representativos y reproducibles. En este sentido, existe una necesidad clara de mejorar los enfoques metodológicos utilizados en la investigación de microorganismos endófitos, con el objetivo de maximizar la recuperación de la diversidad microbiana y optimizar la exploración de sus funciones metabólicas. Proponer estrategias estandarizadas permitirá avanzar en el conocimiento de estos microorganismos y facilitará su aplicación práctica en sistemas productivos sostenibles en el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas.

2.2.2 Métodos de aislamiento y caracterización de endófitos

El estudio de los microorganismos endófitos requiere la implementación de protocolos estandarizados que permitan obtener resultados confiables y reproducibles. Uno de los pasos más críticos es la esterilización superficial del tejido vegetal, ya que su objetivo es eliminar la microbiota epifítica sin afectar la viabilidad de los microorganismos residentes en el interior del tejido. Este proceso se realiza típicamente mediante lavados sucesivos con soluciones como etanol (70–90 %), hipoclorito de sodio (1–4 %) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), seguidos de enjuagues con agua destilada o estéril, la efectividad de esta desinfección puede validarse extendiendo la solución final de lavado sobre medios de cultivo ricos en nutrientes; si no se observa crecimiento después de 1–2 semanas de incubación, se considera que el tejido fue adecuadamente esterilizado (Kashyap et al., 2023).

El aislamiento de endófitos a partir de plantas implica el cultivo de fragmentos vegetales desinfectados (raíces, tallos o hojas) en medios selectivos como PDA, MEA o YEA, generalmente a pH ácido y entre 25 °C y 30 °C, los cuales pueden ser suplementados con antibióticos como estreptomicina o tetraciclina para eliminar bacterias epífitas competidoras, en el caso de hongos, la incubación varía de 2 a 5 días, pudiendo extenderse hasta 16 semanas para especies de crecimiento lento (Adeleke et al., 2021). Posteriormente, se realizan

subcultivos monospóricos para obtener cepas viables, aunque algunos endófitos no crecen en condiciones axénicas por depender de metabolitos del hospedador, para superar esta limitación, se recomienda añadir extracto vegetal al medio de cultivo, la identificación taxonómica se lleva a cabo mediante un enfoque morfo-molecular, utilizando tanto características macroscópicas y microscópicas como secuenciación de regiones ITS o del gen 16S rRNA (Toppo et al., 2022).

Los métodos de aislamiento basados en cultivo, aunque ampliamente utilizados, solo permiten acceder a una pequeña fracción de la comunidad microbiana total debido a la falta de condiciones óptimas para el crecimiento de ciertas especies. Esto sugiere que la selección de los medios de cultivo y las condiciones de incubación es un factor crítico que puede influir significativamente en los resultados obtenidos, técnicas como la metagenómica han mostrado ser herramientas prometedoras para explorar la diversidad estructural y funcional de los endófitos, revelando nuevas oportunidades para su aplicación en agricultura sostenible.

En relación con los patógenos fitosanitarios relevantes en la región de Ambato, estudios previos indican que tanto *Xanthomonas* como *Colletotrichum* prosperan en ambientes cálidos y húmedos. Si bien no se menciona explícitamente Ecuador en los documentos consultados, la presencia de *Xanthomonas phaseoli* en países vecinos como Colombia, donde se ha documentado una alta diversidad genética, sugiere un riesgo potencial para zonas ecuatorianas con condiciones climáticas similares, especialmente en cultivos tropicales como la yuca (Castillo & Llumiquinga, 2021). También, *C. gloeosporioides* ha sido identificado como agente causal de antracnosis en cebolla (*Allium cepa*), una enfermedad también registrada en regiones como Brebes (Java Central), lo que refuerza su relevancia en sistemas agrícolas ecuatorianos (Monobanda et al., 2020).

Para hacer frente a estos patógenos, se han reportado avances en el uso de bacterias endofíticas como agentes de control biológico. Estudios han demostrado que ciertos aislados,

como BBP5.2, pueden inhibir el crecimiento de *Colletotrichum sp.* con eficiencias que oscilan entre el 60 y el 75 %, sin presentar riesgos para plantas ni mamíferos (Toppo et al., 2022). Esta evidencia respalda la importancia de explorar la biodiversidad endofítica local como fuente de estrategias innovadoras de manejo de enfermedades en sistemas productivos sostenibles.

2.2.3 Ensayos de actividad antagonista in vitro

El potencial biocontrolador de microorganismos endófitos se evalúa comúnmente mediante ensayos in vitro, destacando el método de confrontación dual en placas de Petri como herramienta clave para observar la interacción directa entre endófitos y patógenos fitosanitarios como *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.* En este procedimiento, se inoculan ambos microorganismos en extremos opuestos del medio de cultivo, manteniendo condiciones controladas (25 °C, 5–7 días) y evaluando el crecimiento radial del patógeno, así como la zona de inhibición generada. El porcentaje de inhibición, comparado con un control sin endófito, permite cuantificar la actividad antagonista de cada cepa (Gupta & Saxena, 2023).

Estos ensayos son una herramienta clave en las fases iniciales de selección de microorganismos con potencial biocontrolador, ya que facilitan la identificación de cepas capaces de suprimir eficientemente el desarrollo de patógenos relevantes antes de avanzar hacia estudios in vivo o en condiciones de campo. Aunque tanto bacterias como hongos pueden causar enfermedades poscosecha en frutas, los patógenos fúngicos suelen ser los principales responsables de estas alteraciones (Agrawal & Bhatt, 2023). Muchas de estas especies fúngicas requieren una herida mecánica previa como abrasiones, pinchazos de insectos, golpes o rasguños para establecer la infección, lo cual es frecuente durante la cosecha, manipulación y transporte de los productos agrícolas.

El uso de endófitos como agentes de control biológico ha cobrado relevancia en los últimos años debido a su capacidad para suprimir enfermedades mediante mecanismos directos

e indirectos. Estos microorganismos pueden promover el crecimiento vegetal y proteger a las plantas mediante la producción de metabolitos antimicrobianos (antibiosis), la competencia por nutrientes y sitios ecológicos, o la inducción de mecanismos de defensa sistémica adquirida (SAR) o resistencia sistémica inducida (ISR) (Gupta & Saxena, 2023). Además, algunos endófitos son capaces de neutralizar compuestos tóxicos del ambiente, contribuyendo al fortalecimiento de la planta frente a factores de estrés biótico y abiótico.

Los hongos endófitos producen una variedad de metabolitos secundarios bioactivos como péptidos antifúngicos, antibióticos no volátiles, compuestos orgánicos volátiles y enzimas hidrolíticas que han demostrado eficacia frente a diversos fitopatógenos, especialmente en el control biológico de especies como *Colletotrichum sp.*, un problema relevante en cultivos tropicales (Agrawal & Bhatt, 2023). Más allá del ámbito agrícola, estos compuestos presentan aplicaciones potenciales en medicina y biotecnología.

Entre los endófitos bacterianos, géneros como *Burkholderia spp.* destacan por su capacidad para promover el crecimiento vegetal y conferir tolerancia a estreses abióticos, gracias a genes asociados con la fijación de nitrógeno, síntesis de fitohormonas, actividad antimicrobiana y fitorremediación, los ensayos de confrontación dual in vitro constituyen una herramienta fundamental para seleccionar cepas con actividad antagonista, estableciendo una base objetiva para evaluaciones posteriores en condiciones de campo (Pal et al., 2022).

2.3 Marco Teórico

2.3.1 Fitopatógenos de Relevancia Económica en Ecuador:

Microorganismos endófitos como herramienta biotecnológica. Los microorganismos endófitos, definidos como aquellos que colonizan tejidos vegetales sin causar daño aparente al hospedero, han emergido como agentes clave en la biotecnología agrícola por su potencial para promover el crecimiento vegetal y controlar fitopatógenos. Entre sus beneficios se encuentran

la producción de metabolitos secundarios, enzimas líticas y péptidos antimicrobianos, lo que permite su inclusión en estrategias de manejo biológico integrado.

2.3.2 Diversidad y fuentes de endófitos en la provincia de Tungurahua

La provincia de Tungurahua, ubicada en la región central de la Sierra ecuatoriana, presenta una notable diversidad florística que incluye tanto cultivos comerciales (papa, tomate de árbol, maíz) como especies nativas de ecosistemas de páramo y bosque montano. Esta riqueza vegetal actúa como reservorio de una microbiota endofítica diversa, de la cual se han aislado cepas con capacidad bioactiva y propiedades antagonistas frente a plagas y enfermedades agrícolas (Manobanda et al., 2022).

Estudios recientes realizados entre 2016 y 2023 han documentado aislamientos de hongos endófitos de los géneros *Trichoderma*, *Fusarium* (cepas no fitopatógenas), *Alternaria* (linajes no agresivos), así como bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Estas especies han demostrado eficacia en la inhibición de patógenos como *Anthraco*se, *Phoma* y *Xanthomonas* en ensayos in vitro y en condiciones semicontroladas (Nakayinga et al., 2021).

2.3.3 Mecanismos de acción de los endófitos

Los endófitos ejercen su efectividad como agentes de control biológico a través de diversos mecanismos. Primero, mediante la competencia por espacio y nutrientes: al colonizar rápidamente nichos internos de la planta, como los espacios intercelulares o las superficies radiculares, estos microorganismos consumen los recursos disponibles, impidiendo así la instalación y proliferación de patógenos (Pedraza et al., 2022).

Además de la competencia, muchas cepas de endófitos biosintetizan fitohormonas como auxinas, citocininas y giberelinas, las cuales estimulan directamente el crecimiento vegetal y fortalecen sus mecanismos de defensa inherentes. También facilitan procesos clave

como la solubilización de fósforo y la fijación de nitrógeno atmosférico, lo que promueve un mayor vigor y una mejor tolerancia a diversos estreses bióticos. Ciertos endófitos, asimismo, activan respuestas de defensa en la planta hospedera mediante la producción de fitoalexinas, proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y enzimas antioxidantes, tales como peroxidasa o fenilalanina amonio-liasa (Kashyap et al., 2023).

Por su parte, los endófitos fúngicos, habitantes naturales del interior de los tejidos vegetales, pueden ejercer efectos tanto benéficos como perjudiciales, sin embargo, especies benéficas específicas han demostrado una notable capacidad para suprimir hongos fitopatógenos, favoreciendo la salud de la planta de forma directa o indirecta, considerando que la incidencia de enfermedades vegetales se ve acentuada por prácticas agrícolas ineficientes y condiciones ambientales adversas, la necesidad de estrategias de manejo más sostenibles es evidente.

En este contexto, los hongos endófitos contribuyen al control de patógenos activando las respuestas de defensa de la planta, lo que incluye la inducción de expresión génica, la producción de metabolitos bioactivos y la señalización hormonal. La relación mutualista entre estos microorganismos y sus plantas hospederas constituye un pilar fundamental en la supresión natural de enfermedades. Por lo tanto, una caracterización profunda y estratégica de los hongos endófitos con propiedades benéficas, junto con el estudio de sus interacciones con las plantas y los patógenos, resulta esencial para avanzar en el desarrollo de enfoques biológicos eficaces en el control fitopatológico (Adeleke et al., 2022).

2.4 El género *Colletotrichum* y la antracnosis en frutales andinos

Los hongos del género *Colletotrichum* son ampliamente reconocidos como patógenos responsables de la antracnosis, una enfermedad caracterizada por lesiones necróticas hundidas que afectan una gran variedad de cultivos. En Ecuador, esta patología es de especial

preocupación en frutales andinos como el tomate de árbol (*Solanum betaceum*), la mora roja (*Rubus glaucus*) y el aguacate (Persea americana), donde las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* han sido identificadas como los principales agentes etiológicos (Manobanda et al., 2022).

Las condiciones ambientales típicas de la región andina alta humedad relativa y temperaturas entre 13 °C y 20 °C favorecen la aparición de síntomas en los frutos, los cuales se manifiestan como lesiones necróticas oscuras que afectan su valor comercial. Se han reportado pérdidas económicas de hasta un 80 % durante épocas de alta precipitación, sobre todo cuando la infección ocurre en etapas previas a la cosecha y se reactiva durante el almacenamiento o transporte.

El control químico convencional mediante fungicidas sistémicos (triazoles, benzimidazoles) y protectantes se ha vuelto menos eficaz debido al desarrollo de cepas resistentes y a las restricciones impuestas por mercados internacionales respecto a residuos tóxicos. En este sentido, *Colletotrichum* se consolida como un modelo fúngico adecuado para evaluar estrategias de control biológico basado en microorganismos endófitos, los cuales podrían ofrecer una alternativa sostenible y ecológicamente segura (Valle et al., 2022).

Colletotrichum sp. y la enfermedad de la antracnosis. La antracnosis, enfermedad de etiología fúngica causada por varias especies del género *Colletotrichum*, se caracteriza por lesiones necrosadas y confluentes en tejidos foliares, frutos y ramas jóvenes. Estas lesiones suelen emerger durante la floración o fructificación, aunque frecuentemente permanecen latentes hasta la poscosecha.

En cultivos de importancia como el mango (*Mangifera indica*), se considera la enfermedad más destructiva bajo condiciones de alta humedad. Los síntomas incluyen manchas oscuras y deprimidas en frutos en maduración. En banano y guayaba, la infección también

puede mantenerse latente, reactivándose durante el almacenamiento, lo que representa un problema crítico para la bioseguridad en la exportación (Dofuor et al., 2023).

En el caso del altramuz (*Lupinus spp.*), la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* es la enfermedad más severa, con diseminación por semilla e inóculo secundario transmitido por viento o lluvia, en el sorgo, *C. sublineolum* y *C. graminicola* causan necrosis foliar y pudrición de la espiga, afectando el rendimiento en más del 50 % en zonas tropicales. Estudios recientes indican que algunas especies del género pueden comportarse como endófitos sin generar síntomas, como ha sido observado en hojas de cacao en Ecuador. Esto sugiere una posible transición hemibiotrófica en el ciclo de vida del patógeno, donde coexiste como endófito antes de manifestarse como fitopatógeno (Peralta et al., 2023).

El potencial de migración entre hospedadores y la persistencia latente subrayan la necesidad de enfoques de manejo más integrales, capaces de reducir la presión selectiva sobre los agroecosistemas y mitigar riesgos fitosanitarios a nivel regional e internacional.

Estrategias de manejo. El control de la antracnosis ha estado históricamente centrado en la aplicación de fungicidas como los benzimidazoles y los inhibidores de biosíntesis de esteroides. No obstante, el uso reiterado de estos compuestos ha inducido la aparición de resistencia fúngica, además de plantear riesgos para la salud humana y el medio ambiente (Dofuor et al., 2023).

2.5 El género *Xanthomonas* y su repercusión agronómica

Xanthomonas es un género de bacterias Gram negativas que agrupa numerosas especies y patovares fitopatógenos, responsables de enfermedades en más de 400 especies vegetales. En Ecuador, destacan *Xanthomonas campestris* y *Xanthomonas axonopodis*, asociadas a la mancha bacteriana y al tizón en solanáceas y leguminosas, afectando cultivos como tomate, pimiento y frijol (Giovanardi et al., 2025).

Las lesiones típicas son necróticas, con bordes cloróticos, reduciendo el área fotosintética y provocando defoliación. A nivel molecular, su virulencia se relaciona con sistemas de secreción especializados, principalmente el sistema de secreción tipo III (T3SS), que permite la inyección de efectores como proteínas Xop y TAL en las células vegetales. Estos efectores interfieren con las respuestas inmunitarias del hospedero, favoreciendo la colonización y persistencia del patógeno (Nakayinga et al., 2021).

Adicionalmente, se han identificado componentes esenciales como los polisacáridos extracelulares (EPS), especialmente la goma xantana, y los lipopolisacáridos (LPS), que participan en la formación de biofilms, protegen contra agentes antimicrobianos y facilitan la interacción con el hospedero (Insuasti et al., 2022).

Otros mecanismos incluyen la señalización mediante el factor de difusión DSF, el mensajero intracelular c-di-GMP y sistemas de transporte dependientes de TonB, todos los cuales contribuyen a una patogenicidad altamente regulada. La complejidad del sistema de infección de *Xanthomonas*, su capacidad de adaptación a distintos hospederos y la creciente resistencia a bactericidas, refuerzan la necesidad de estrategias alternativas basadas en agentes de biocontrol, entre ellos los microorganismos endófitos (Giovanardi et al., 2025).

La selección de los géneros *Xanthomonas* y *Colletotrichum* como modelos para este estudio se basa en su alta prevalencia en sistemas agrícolas ecuatorianos y en el impacto económico que generan en cultivos de exportación. Ambas especies han mostrado resistencia creciente a los tratamientos convencionales, lo que ha motivado la búsqueda de alternativas más sostenibles (Rodríguez et al., 2023).

2.7 El complejo patológico *Bactericera cockerelli* – *Candidatus Liberibacter solanacearum*

El insecto *B. cockerelli*, conocido comúnmente como psílido de la papa o paratrioza, es un hemíptero de la familia *Psyllidae* que ha expandido su rango geográfico en las últimas

décadas debido a factores como el transporte de material vegetal contaminado y el cambio climático, los cuales han favorecido su adaptación a nuevos nichos ecológicos. En zonas templadas y subtropicales, el insecto puede completar múltiples generaciones por año, incrementando el riesgo de epidemias bajo condiciones óptimas de temperatura y humedad.

Por su parte, *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLso) es una bacteria fitopatógena, intracelular obligada, de tipo gramnegativo, que no puede ser cultivada en medios sintéticos convencionales. Su nicho primario es el floema de plantas hospedantes, principalmente de las familias *Solanaceae* y *Apiaceae*. A la fecha, se han identificado al menos ocho haplotipos (A, B, C, D, E, F, H, R), con variación en su afinidad por hospederos y vectores. El haplotipo A está principalmente relacionado con el síndrome *zebra chip* en papa, mientras que el B se asocia con enfermedades en pimiento y apio en América del Norte (Mora et al., 2021).

En plantas infectadas, los síntomas incluyen:

- En papa: estrías oscuras en tubérculos que se evidencian al freír, necrosis interna, defoliación severa y pérdida de peso.
- En tomate y pimiento: enrollamiento foliar, clorosis internerval, reducción del crecimiento y deformación de frutos.

2.8 Limitaciones del manejo convencional de plagas

2.8.1 Dependencia de insecticidas químicos

El control de plagas como *B. cockerelli*, así como de enfermedades causadas por *Xanthomonas* y *Colletotrichum*, en la agricultura ecuatoriana ha estado históricamente basado en la aplicación intensiva de agroquímicos. En el caso del psílido de la papa, se requieren entre 16 y 30 aplicaciones por ciclo para mantener las poblaciones bajo el umbral económico, utilizando insecticidas como organofosforados, carbamatos y piretroides (Wenninger 2024).

En cuanto a *Xanthomonas* y *Colletotrichum*, se estima que en Ecuador su manejo conlleva altos costos productivos y pérdidas por disminución de calidad de exportación. Además, la dependencia de fungicidas y bactericidas genera acumulación de residuos en productos y pérdida de eficacia por resistencia fúngica (Rodríguez et al., 2023).

Debido a que CLso no puede cultivarse in vitro, se ha adoptado a *Xanthomonas sp.* como modelo experimental para ensayos de control biológico. Ambas bacterias son gramnegativas y afectan tejidos vasculares de solanáceas, lo que justifica en parte el uso de esta analogía experimental. El uso de *Colletotrichum* permite además simular interacciones con hongos filamentosos de alto impacto en la región.

El empleo conjunto de *Xanthomonas* y *Colletotrichum* en estudios in vitro posibilita:

1. Evaluar la acción antagonista de endófitos frente a bacterias y hongos patógenos relevantes.
2. Evitar riesgos fitosanitarios derivados del manejo de CLso vivo.
3. Identificar cepas endofíticas de amplio espectro con potencial uso como bioinsumos agrícolas.

2.9 Posicionamiento conceptual de la investigación

El estudio toma como base el paradigma del antagonismo microbiano, considerando a *Xanthomonas* como modelo de bacteria gramnegativa y a *Colletotrichum* como representante fúngico fitopatógeno predominante en frutales andinos.

Aunque existen diferencias en cuanto a transmisión y especificidad de vectores, la profundidad del conocimiento en *Xanthomonas* en cuanto a secreción de efectores, formación de biofilm y adaptación al hospedero es invaluable para el diseño de estrategias de control.

El marco metodológico adoptado es descriptivo-explicativo con un diseño experimental y enfoque cuantitativo, fundamentado en el paradigma positivista. Se aplican métodos teóricos como análisis-síntesis, inducción-deducción y enfoque histórico-lógico, junto con métodos empíricos como medición del porcentaje y zona de inhibición en ensayos in vitro, observación sistemática de características morfológicas, ensayos de confrontación dual controlada para validar actividad antagonista.

Esta perspectiva metodológica se alinea con las tendencias globales de la biotecnología agrícola sostenible, que buscan reducir la dependencia de insumos químicos y fomentar el uso de microorganismos nativos como agentes de control biológico. Además, la investigación busca contribuir con conocimiento local sobre la diversidad de endófitos y promover el desarrollo de bioinoculantes específicos para el contexto ecuatoriano, fortaleciendo así la seguridad alimentaria, reduciendo costos de producción y mitigando impactos ambientales negativos.

CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

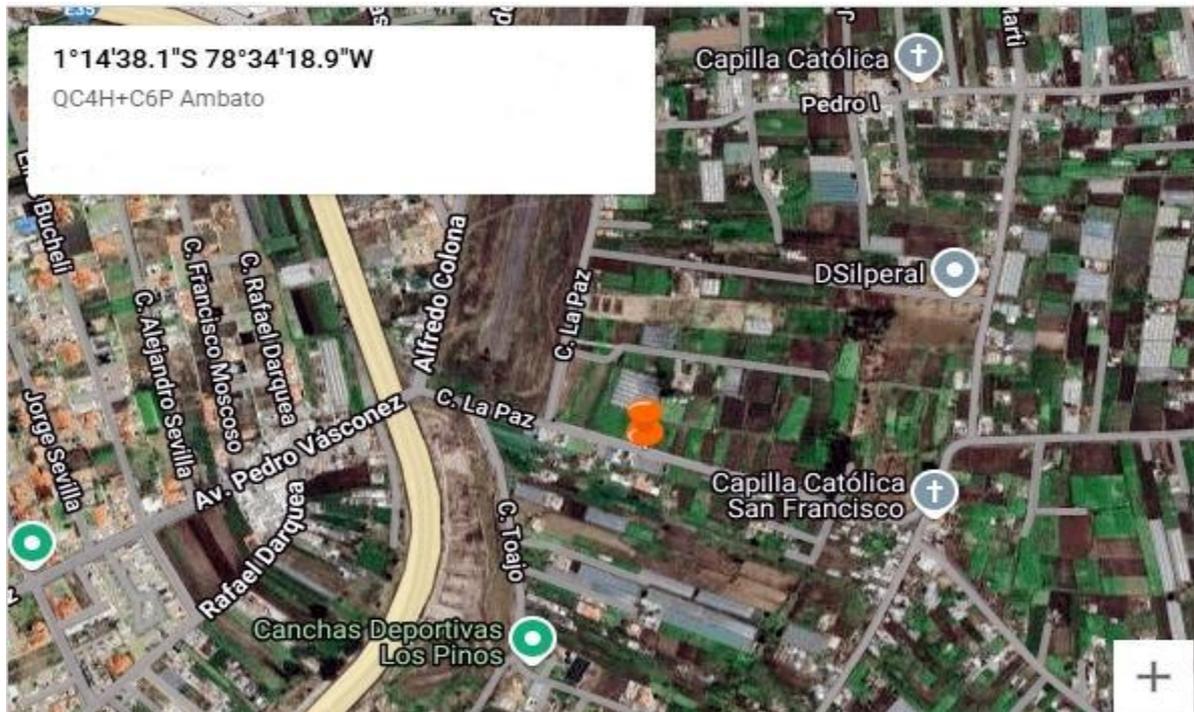
3.1 Sitio de muestreo y colecta de muestras vegetales

La fase de muestreo y colecta vegetal se realizó en zonas agrícolas y agroecosistemas ubicados en los alrededores de la ciudad de Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador. Esta región fue seleccionada por su diversidad florística y su relevancia agrícola en el país. Como punto de referencia geográfico, se tomó el conjunto de coordenadas -1.2215081656311217, -78.57504647630647, en torno a las cuales se delimitaron las áreas de exploración.

Durante esta etapa, se recolectó un volumen considerable de material vegetal perteneciente a 20 especies distintas, las especies seleccionadas fueron elegidas estratégicamente por su relevancia agroecológica, su presencia abundante en la zona y su

historial empírico de resistencia a enfermedades. La Tabla 2 presenta el listado completo de especies muestreadas.

Figura 1: Ubicación de los sitios de recolección de muestras vegetales cercanas a la ciudad de Ambato, Ecuador. Fuente: Google Maps.

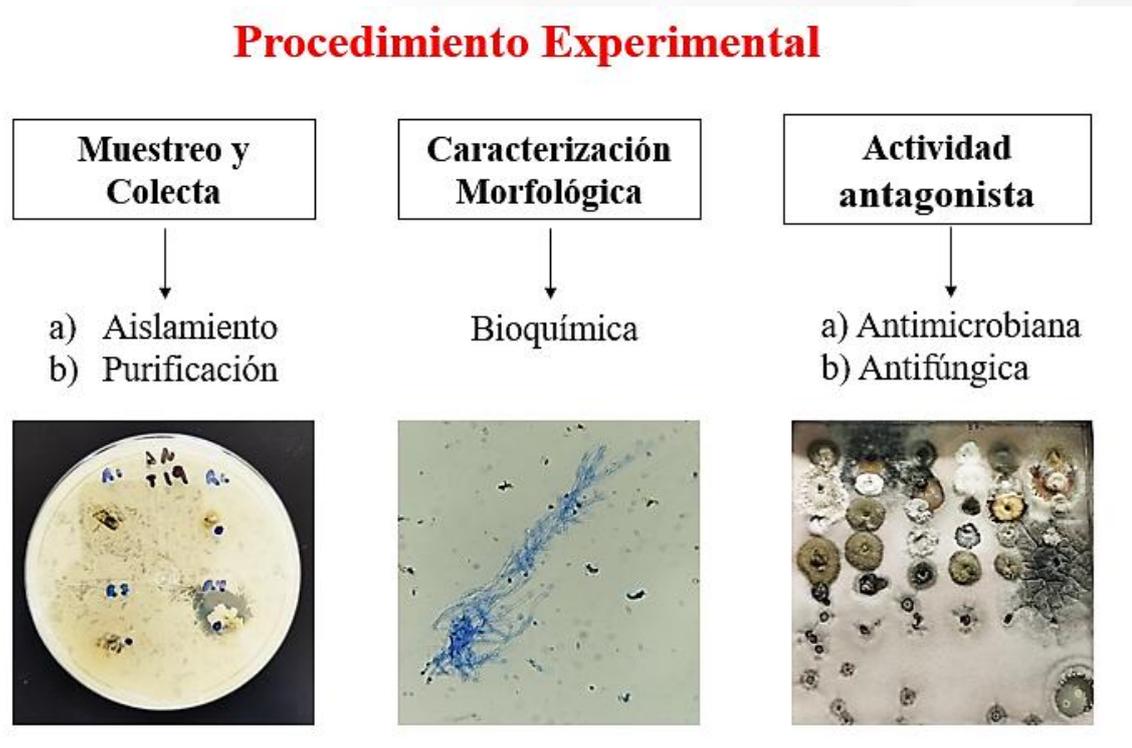


Esquema general de la investigación

La investigación se enfocó en la prospección de microorganismos endófitos, seleccionando veinte (20) especies vegetales hospedantes, la elección de estas plantas se fundamentó en su uso tradicional, interés agrícola o su presencia característica en los agroecosistemas de la región, la presencia de endófitos es considerada un signo de un sistema vegetal sano, y la selección estratégica de plantas de diferentes ecosistemas o con valor etnobotánico es crucial para descubrir endófitos potenciales con distintas características biosintéticas.

Figura 2: Etapas del procedimiento experimental de la investigación. Fuente:

Autores.



El proceso experimental se inició con el muestreo y la colecta de material vegetal, seguido del aislamiento y purificación de microorganismos endófitos mediante cultivo en medios nutritivos sólidos (Agar Nutritivo y PDA) en placas Petri. Posteriormente, se realizó una caracterización morfológica y bioquímica detallada para establecer la estructura y el grupo taxonómico de hongos y bacterias aislados.

La actividad antagonista fue evaluada utilizando toda la biblioteca endofítica obtenida. Los aislados con mayor capacidad inhibitoria fueron seleccionados y sometidos a una nueva purificación, para ser cultivados en medio mínimo líquido, con el fin de determinar su curva de crecimiento. Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de confrontación dual para evaluar su actividad antimicrobiana específica frente a *Colletotrichum sp.* y *Xanthomonas sp.*

Tabla 2: *Especies vegetales hospedantes seleccionadas para el aislamiento de microorganismos endófitos. Fuente: Autores.*

<u>Hosp_codigo</u>	<u>Hospedante</u>	<u>Nombre Científico</u>
T1	Hierba buena	<i>Mentha spicata</i>
T2	Cedrón	<i>Aloysia citrodora</i>
T3	Toronjil	<i>Melissa officinalis</i>
T4	Pataconyuyo	<i>Peperomia peltigera</i>
T5	Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>
T6	Ruda	<i>Ruta graveolens</i>
T7	Arrayan	<i>Myrtus communis</i>
T8	Llantén	<i>Plantago major</i>
T9	Diente de León	<i>Taraxacum officinale</i>
T10	Tomate de árbol	<i>Solanum betaceum</i>
T11	Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>
T12	Lavanda	<i>Lavandula angustifolia</i>
T13	Limón	<i>Citrus limon</i>
T14	Calistemo	<i>Callistemon citrinus</i>
T15	Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>
T16	Morquera	<i>Morus alba</i>
T17	Malva lorosa	<i>Malva sylvestris</i>
T18	Menta	<i>Mentha piperita</i>
T19	Orégano	<i>Origanum vulgare</i>
T20	Higo	<i>Ficus carica</i>

El protocolo de campo se ejecutó con rigurosas medidas de asepsia para asegurar la integridad de las muestras. La recolección se efectuó preferentemente en horario matutino (08:00-11:00) para minimizar la variabilidad fisiológica de los tejidos y la carga de microbiota epífita. Se emplearon herramientas de corte estériles, específicamente hojas de bisturí flameadas con alcohol etílico al 70% (v/v) antes de cada incisión, a fin de prevenir la contaminación cruzada. Inmediatamente después del corte, cada muestra fue acondicionada de forma individual en bolsas plásticas de primer uso, con cierre hermético, y etiquetada con información de trazabilidad (fecha, tipo de tejido, especie hospedante y georreferenciación).

Para preservar la viabilidad de la comunidad endofítica, las muestras se transportaron en una nevera portátil con acumuladores de frío (aprox. 4-10 °C) hasta el laboratorio de

biotecnología de la empresa Bioseb Organics. La gestión del tiempo fue un factor crítico, las muestras recolectadas por la mañana se procesaron el mismo día, mientras que las de la tarde se mantuvieron en refrigeración (aprox. 4 °C) para ser procesadas a primera hora del día siguiente. Esta estrategia de procesamiento rápido es fundamental para maximizar la recuperación de microorganismos viables.

3.2 Aislamiento y purificación de bacterias y hongos endófitos

El aislamiento de los microorganismos endófitos se llevó a cabo siguiendo un protocolo estricto, cuyo objetivo fue eliminar la microbiota epífita para asegurar la recuperación exclusiva de los organismos que habitan en el interior de los tejidos vegetales. De cada muestra de tejido sano (hojas y tallos), se seccionaron asépticamente cinco fragmentos, o explantes, de aproximadamente 0.5 cm².

Estos explantes fueron sometidos a un riguroso proceso de desinfección superficial secuencial, un paso obligatorio y crítico en la investigación de endófitos. El protocolo consistió en: (i) lavados iniciales con agua destilada estéril, (ii) inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 3 minutos, (iii) tres enjuagues sucesivos con agua destilada estéril para eliminar residuos del agente desinfectante, y (iv) un tratamiento final con peróxido de hidrógeno al 3% por 1 minuto. Concluido el proceso, los explantes se secaron sobre papel absorbente estéril en condiciones de asepsia para su siembra inmediata.

Para el cultivo selectivo, los explantes desinfectados se sembraron en dos medios de cultivo diferenciados. El aislamiento de hongos endófitos se realizó en placas de Petri (90 mm) con Agar Papa Dextrosa (PDA, DIFCO), suplementado con el antibiótico rifampicina. Para ello, se añadieron 5 µL de una solución madre de rifampicina (5 mg/L) a cada 20 mL de medio, resultando en una concentración final aproximada de 1.25 ng/mL, con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano.

Paralelamente, para el aislamiento de bacterias endófitas, se utilizó Agar Nutriente (AN, DIFCO), suplementado con el antifúngico nistatina. En este caso, se incorporaron 5 μL de una solución madre de nistatina (75 mg/mL) a cada 20 mL de medio, alcanzando una concentración final de aproximadamente 18.75 $\mu\text{g/mL}$ para suprimir el desarrollo fúngico competitivo. En cada placa se depositaron cuatro explantes por cuadrantes (R1, R2, R3, R4) y se sellaron para su incubación a una temperatura constante de 27 °C.

El monitoreo fue continuo, con observaciones diarias durante 7 días para detectar la emergencia de colonias bacterianas, y revisiones cada 48 horas en las placas de PDA para seguir el desarrollo, típicamente más lento, de los hongos.

3.3 Caracterización morfológica y bioquímica

Tras la fase de aislamiento y purificación, se procedió a la caracterización de un subconjunto seleccionado de los aislados endofíticos, compuesto por 61 cepas bacterianas y 35 cepas fúngicas. La identificación taxonómica preliminar de estos microorganismos se realizó mediante un enfoque polifásico, que integra el análisis de características culturales, macromorfológicas y micromorfológicas. Este método es fundamental para la clasificación inicial en la taxonomía microbiana.

Descripción de aislados bacterianos. La caracterización de los 61 aislados bacterianos purificados se realizó en dos niveles:

Caracterización Macroscópica. Se evaluaron las características de las colonias desarrolladas en medio Agar Nutriente (AN). Se registraron sistemáticamente los siguientes descriptores: forma de la colonia, tipo de margen, elevación, naturaleza de la superficie, brillo, textura y color, este último se referenció con una guía colorimétrica (BS 381C:1988) para estandarizar la descripción.

Caracterización Microscópica. Se aplicó la tinción de Gram, una técnica diferencial esencial para determinar la arquitectura de la pared celular. Mediante microscopía óptica (Nikon®) se evaluó la afinidad tintorial de cada aislado (Gram-positivo o Gram-negativo), así como su morfología celular y su patrón de agrupación.

3.3.1 Descripción de aislados fúngicos

La caracterización de los 35 aislados fúngicos seleccionados implicó un análisis detallado de sus rasgos vegetativos y reproductivos, crucial para su correcta identificación a nivel de morfotipo.

Caracterización Macroscópica. Se describieron las colonias desarrolladas en medio Agar Papa Dextrosa (PDA), observando el color del anverso y reverso, la producción de pigmentos difusibles en el agar y la textura superficial de la colonia.

Caracterización Microscópica. Se prepararon montajes húmedos con azul de lactofenol o azul de lactoglicerol a partir de los cultivos axénicos. Las preparaciones se examinaron bajo un microscopio óptico (Nikon®) a magnificaciones de 20x, 40x y 100x. Se evaluaron las características del micelio vegetativo y, de manera fundamental, la morfología de las estructuras de reproducción asexual y sexual, si se presentaban. Dado que la esporulación es un criterio taxonómico clave, se implementó una estrategia para inducirla en aquellos aislados que no la presentaban de forma espontánea en PDA.

Los morfotipos se cultivaron en placas con Agar Agua (WA) al 2%, un medio de cultivo pobre en nutrientes que promueve la diferenciación de estructuras reproductivas. Las placas se incubaron por 14 días a 27 °C, con verificación diaria del desarrollo micelial y la formación de esporas. La identificación preliminar de los morfotipos fúngicos se realizó integrando la información macro y microscópica, y contrastándola con claves dicotómicas especializadas. Para la documentación y registro, se capturaron fotomicrografías

representativas de las estructuras distintivas de cada aislado mediante una cámara digital (Xiaomi Redmi Note 13) acoplada a uno de los oculares del microscopio.

3.4 Screening para la actividad antimicrobiana mediante enfrentamiento de colonias

El objetivo de esta fase fue realizar un cribado (*screening*) para evaluar el potencial antagonista *in vitro* de la colección de aislados endofíticos. Esta etapa es fundamental para identificar cepas con la capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos de relevancia económica, con el fin de construir una "biblioteca" de microorganismos con potencial para el biocontrol. El estudio se centró en dos patógenos modelo: la bacteria Gram-negativa *Xanthomonas* sp. y el hongo fitopatógeno *Colletotrichum* sp.

La selección de *Xanthomonas* se fundamenta en su importancia como patógeno agrícola; por ejemplo, la especie *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* es el agente causal del tizón común del frijol, una enfermedad de amplia distribución (Corzo López et al., 2015). Para esta evaluación, se implementó un ensayo de confrontación dual (antagonismo directo) en placas de Petri. Endófitos (bacterias y hongos) frente a *Xanthomonas* sp. Para evaluar la actividad antibacteriana, se prepararon placas con medio Agar Nutriente (NA) inoculado en masa con una suspensión del patógeno *Xanthomonas* sp., ajustada a una concentración de 5.40×10^7 UFC/mL.

Una vez solidificado el medio, se procedió a la confrontación, para los aislados endofíticos bacterianos, se tomaron muestras de colonias puras utilizando un sacabocados estéril y se depositaron en contacto directo con el agar inoculado. De manera análoga, para los aislados fúngicos, se emplearon discos de micelio-agar de 0.5 cm de diámetro, extraídos del margen de crecimiento activo de los cultivos puros.

Como controles de referencia, se incluyeron discos impregnados con nistatina (75 mg/mL, 5 μ L) y rifampicina (5 mg/L, 5 μ L) para confirmar la sensibilidad del patógeno a agentes antimicrobianos, una práctica estándar en bioensayos de antagonismo.

Endófitos (bacterias y hongos) frente a *Colletotrichum sp.* El ensayo para determinar la actividad antifúngica siguió un protocolo similar. En este caso, se utilizaron placas con Agar Papa Dextrosa (PDA), inoculadas con una suspensión de esporas de *Colletotrichum sp.* a una concentración de 1.33×10^6 esporas/mL. Sobre esta capa de patógeno, se colocaron discos de los aislados endofíticos (bacterianos y fúngicos) de la misma manera que en el ensayo anterior.

Todas las cajas de acero inoxidable estériles de confrontación, para ambos patógenos, se incubaron a 28 °C, la evaluación de la inhibición del crecimiento se realizó de manera periódica a las 48, 72 y 96 horas, registrando y midiendo la formación de halos de inhibición (zonas claras de no crecimiento del patógeno) alrededor del aislado endofítico. La capacidad de los endófitos para producir compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana es una de sus características más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas.

3.5 Detección de metabolitos antimicrobianos en extractos crudos de aislados promisorios

Para investigar la base química de la actividad antagonista observada en los ensayos de confrontación directa, se procedió a la producción, extracción y evaluación de metabolitos secundarios a partir de las cepas endofíticas más prometedoras. Los hongos endófitos y las bacterias son reconocidos como una fuente prolífica de metabolitos secundarios bioactivos con una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo la antimicrobiana. Para esta fase, se seleccionaron dos aislados fúngicos (JOB-20 y JOB-25) y un aislado bacteriano (BAC-25), que demostraron la mayor capacidad inhibitoria en los ensayos descritos en 3.4.

Obtención de los extractos crudos. El proceso se inició con la fermentación en pequeña escala para escalar la biomasa y la producción de metabolitos. Los aislados fúngicos se

cultivaron en Medio Mínimo para Hongos (MMF), compuesto por: glucosa (10 g/L), extracto de levadura (2 g/L), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 , 1 g/L) y sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L), con un pH ajustado a 5.6.

Para el aislado bacteriano, se utilizó un medio estéril compuesto por: extracto de levadura (4 g/L), fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4 , 4 g/L), solución de sales traza (1 mL/L) y melaza (5 mL/L), con un pH de 6.8. Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 200 mL del medio respectivo, y se incubaron en un agitador orbital a 120 rpm y a una temperatura de 25-30 °C. La agitación constante aseguró una adecuada oxigenación, factor crucial para el metabolismo microbiano y la síntesis de metabolitos.

Con el fin de identificar la fase de crecimiento asociada a la mayor producción de compuestos bioactivos, se realizó una cinética de producción. Se tomaron alícuotas de los cultivos en diferentes intervalos de tiempo: a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas para la bacteria, y a las 24, 72, 120, 168 y 240 horas para los hongos. Estas muestras se diluyeron en serie (10^{-3} a 10^{-7}) y se sembraron en placas de agar para un análisis cuantitativo del crecimiento celular. Al culminar el periodo de fermentación, los caldos de cultivo completos se sometieron a un tratamiento térmico (60 °C por 30 minutos). Este procedimiento fue diseñado para inactivar las células microbianas, obteniendo así un extracto crudo que contenía únicamente los metabolitos termoestables secretados al medio, los cuales fueron evaluados en los siguientes bioensayos.

Screening frente a *Xanthomonas sp.* La actividad antibacteriana de los extractos crudos termoestables se evaluó mediante un ensayo de difusión en agar. Se prepararon placas de Agar Nutriente sobre las cuales se distribuyó uniformemente una suspensión del fitopatógeno *Xanthomonas sp.*, ajustada a una concentración de 5.40×10^7 UFC/mL, para formar un césped bacteriano. Posteriormente, los extractos crudos se aplicaron mediante contacto directo sobre

la superficie del agar. La efectividad se determinó tras un periodo de incubación, midiendo el diámetro de los halos de inhibición formados alrededor del punto de aplicación del extracto.

Screening frente a Colletotrichum sp. De manera análoga, se evaluó la actividad antifúngica de los extractos crudos contra *Colletotrichum sp.* Se prepararon placas de Agar Papa Dextrosa (PDA) inoculadas con una suspensión del patógeno ajustada a 1.33×10^6 esporas/mL.

3.6 Análisis de datos

Durante el desarrollo del estudio, se generaron tres conjuntos principales de datos: (1) morfológicos, (2) de actividad antimicrobiana (*screening*) y (3) dinámica de fermentación de los aislados seleccionados. A continuación, se detalla el análisis realizado para cada uno.

Datos Morfológicos (1). Las variables obtenidas a partir de la descripción macroscópica de las colonias fueron de naturaleza categórica, correspondientes a características cualitativas tales como forma, margen, elevación, color y textura. Para cada aislado se utilizó una única observación (una réplica), que fue empleada para conformar una matriz de datos completa. El análisis se realizó mediante estadística descriptiva, utilizando herramientas de Microsoft Excel, incluyendo tablas dinámicas, con el fin de resumir y organizar las categorías observadas.

Datos de Actividad Antimicrobiana o *Screening* (2). Con el propósito de agrupar los aislados obtenidos del campo y purificados según sus características morfológicas y funcionales iniciales en particular su antagonismo frente a *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.*, se procedió a integrar y fusionar las matrices de datos previamente descritas.

Para ello, las variables cualitativas originales fueron codificadas numéricamente de acuerdo con sus niveles, convirtiéndolas en variables nominales para su análisis estadístico.

Codificación de variables morfológicas:

- Bacterias:
 - Margen: rizoide → 1, ondulado → 2, entero → 3
 - Superficie: rugosa → 1, lisa → 2
 - Brillo, Textura, Color, Tinción de Gram, Morfología celular y

Observaciones: clasificadas y codificadas siguiendo criterios similares.

- Hongos:
 - Se aplicó una codificación equivalente basada en las características morfológicas observadas.

Una vez codificadas, estas variables se sometieron a un análisis de conglomerados (*cluster analysis*), realizado por separado para bacterias y hongos, usando el software InfoStat (versión 2020e). Esta metodología permitió agrupar los aislados en función de similitudes morfológicas y funcionales iniciales (INFOSTAT, 2020).

Dinámica de Fermentación de Aislados Seleccionados (3). La cinética de crecimiento de los aislados seleccionados fue evaluada durante un periodo de 240 horas, con muestreo cada 24 horas y tres réplicas técnicas por punto temporal. El ensayo se realizó una única vez, complementado con tres replicaciones biológicas adicionales.

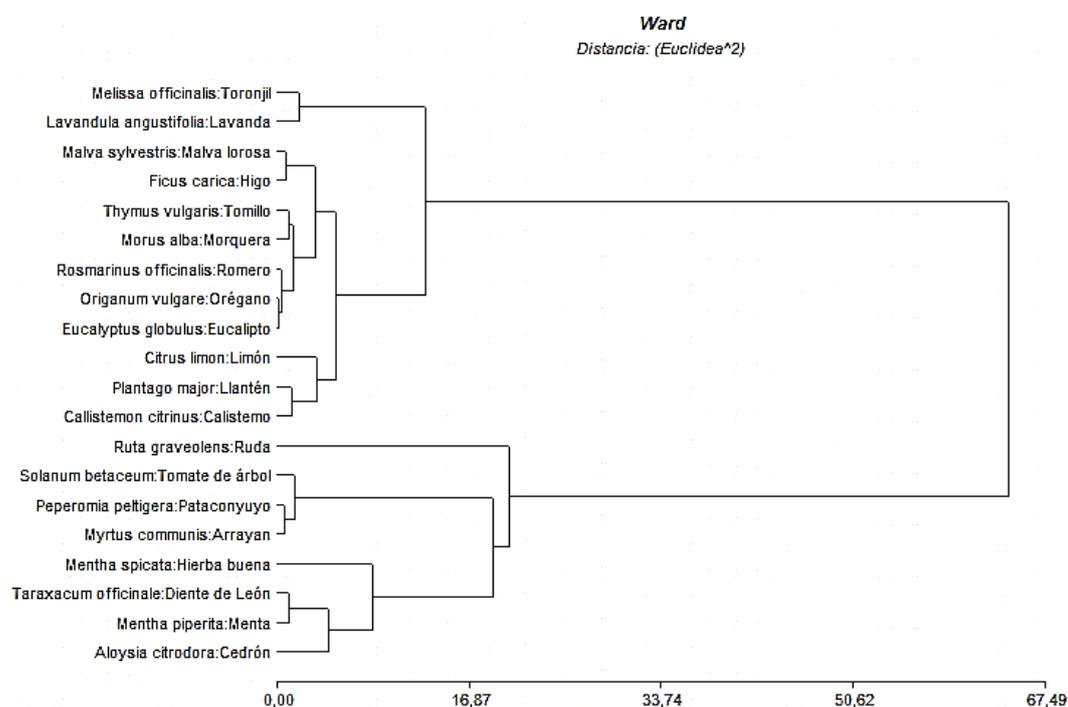
Los datos cuantitativos generados permitirán caracterizar los patrones temporales de crecimiento y producción de metabolitos, aspectos clave para la selección final de cepas con potencial biotecnológico.

CAPÍTULO IV: Resultados

En este capítulo se presentan y analizan los hallazgos experimentales obtenidos en el estudio. La estructura sigue el flujo de trabajo metodológico, comenzando con la caracterización de la diversidad microbiana aislada, seguido por la evaluación cuantitativa de su potencial antagonista y culminando con el análisis de la cinética de crecimiento de las cepas más prometedoras.

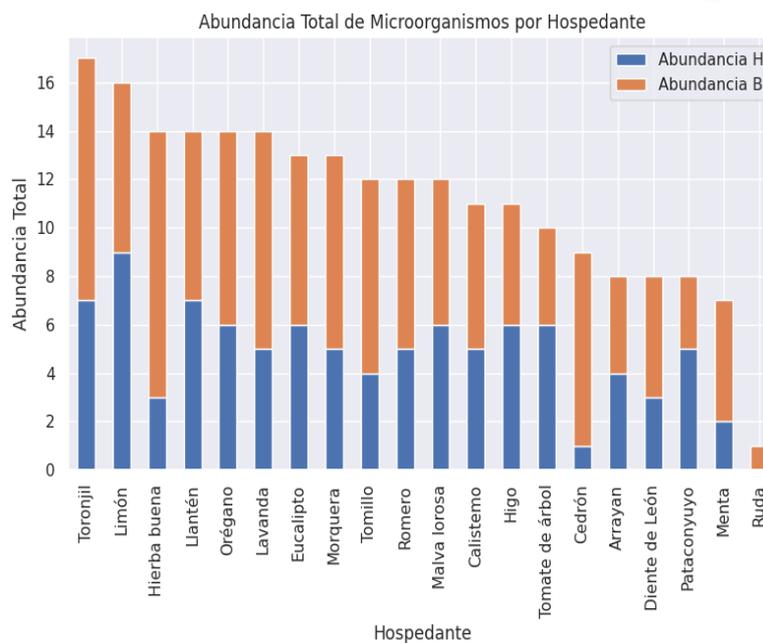
Se identificaron tres grupos principales: Grupo 1 (Toronjil, Lavanda, Tomillo), con perfiles microbianos equilibrados; Grupo 2 (Romero, Eucalipto, Limón), con mayor variabilidad en la proporción hongos/bacterias; y Grupo 3 (Menta, Cedrón, Diente de león), con comunidades únicas y especializadas. La altura de las ramas indica el grado de disimilitud entre especies.

Figura 3: Dendrograma de agrupamiento jerárquico (método de Ward, distancia euclidiana al cuadrado) que clasifica 20 especies vegetales según la similitud en la composición de sus endófitos aislados (hongos y bacterias). Fuente: Autores.



El análisis mostró que las plantas del Grupo 1 (*Melissa officinalis*, *Lavandula angustifolia*, *Thymus vulgaris*) presentan alta diversidad de hongos y bacterias endófitas, el Grupo 3, con especies como *Aloysia citrodora* y *Mentha spp.*, estuvo dominado por bacterias adaptadas a compuestos antimicrobianos (citrал, mentol), lo que se reflejó en una menor diversidad fúngica.

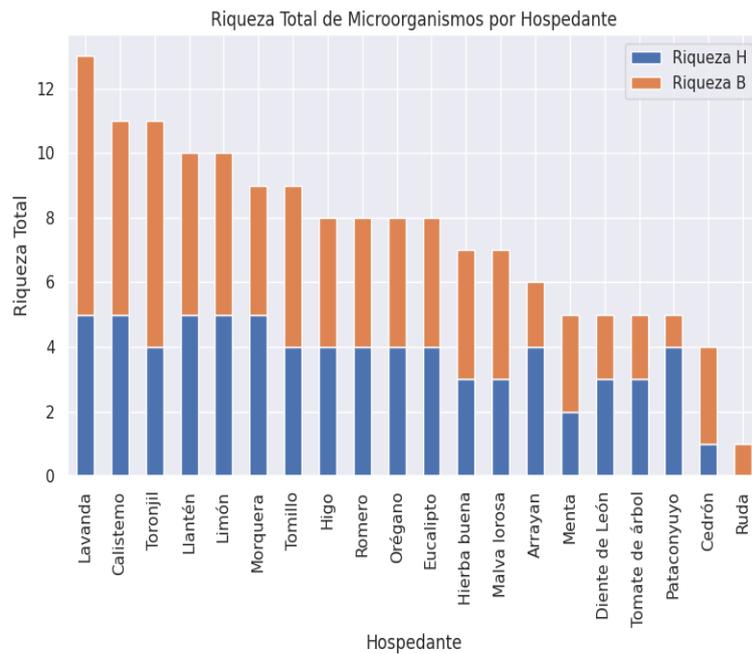
Figura 4: Abundancia total de microorganismos por hospedante. Fuente: Autores.



La abundancia y riqueza de microorganismos endófitos revela una distribución no homogénea de las comunidades microbianas albergadas por las distintas especies vegetales hospedantes.

Se observa una tendencia predominante en la contribución de los aislados bacterianos (BAC) sobre los fúngicos (JOB) en la composición total.

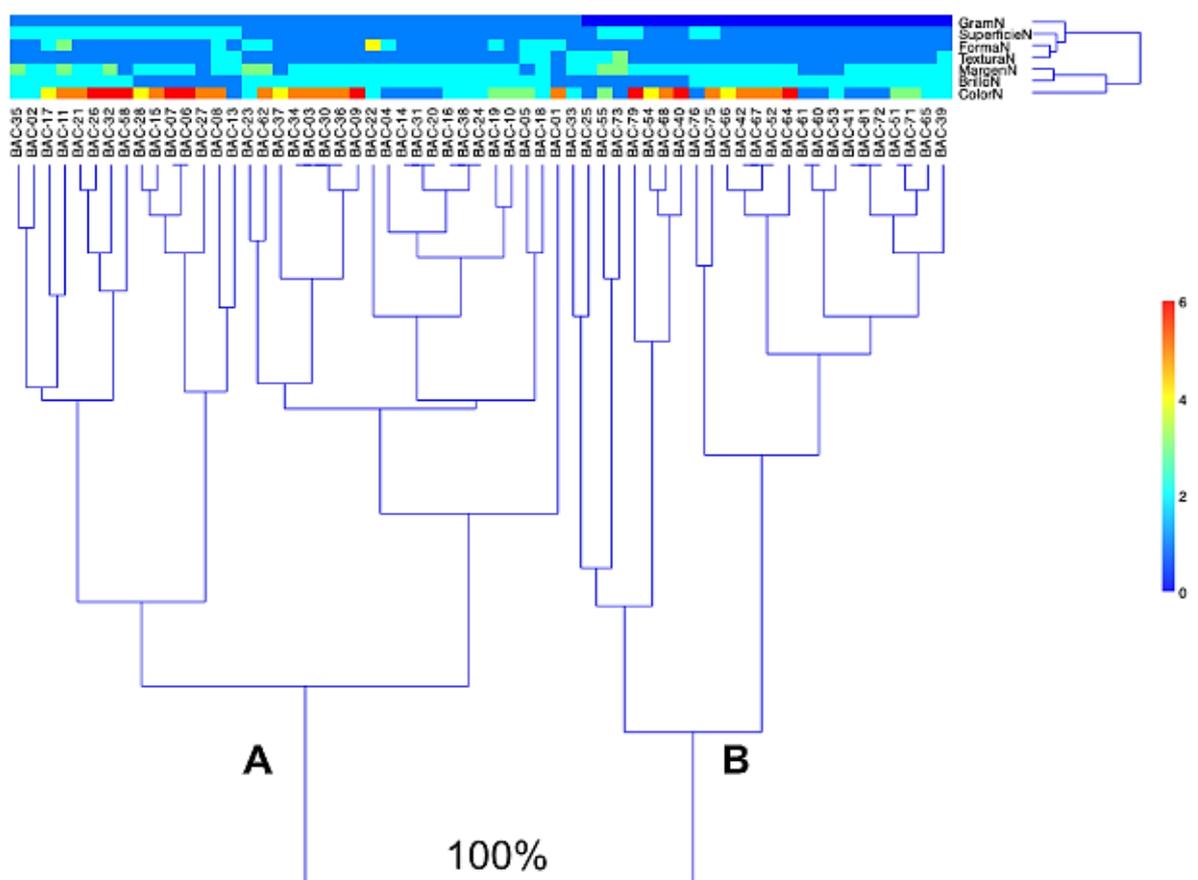
Figura 5: Riqueza total de microorganismos por hospedante. Fuente: Autores.



Específicamente, Toronjil, Limón y Hierba buena se identifican como los hospedantes con mayor abundancia total de endófitos, mientras que Lavanda, Calistemo, Toronjil y Llantén exhiben la mayor riqueza. Al segmentar por filo, Limón se establece como el principal hospedante para hongos endófitos (evaluado por la suma de abundancia y riqueza fúngica), y Lavanda junto con Toronjil para bacterias endófitas.

Esta diferenciación en el potencial de las especies vegetales para albergar comunidades endofíticas es de capital importancia para orientar estrategias de bioprospección en Ecuador, optimizando la identificación eficiente de especies vegetales promisorias y la subsiguiente búsqueda de agentes de biocontrol con base en la composición específica de sus microbiotas internas.

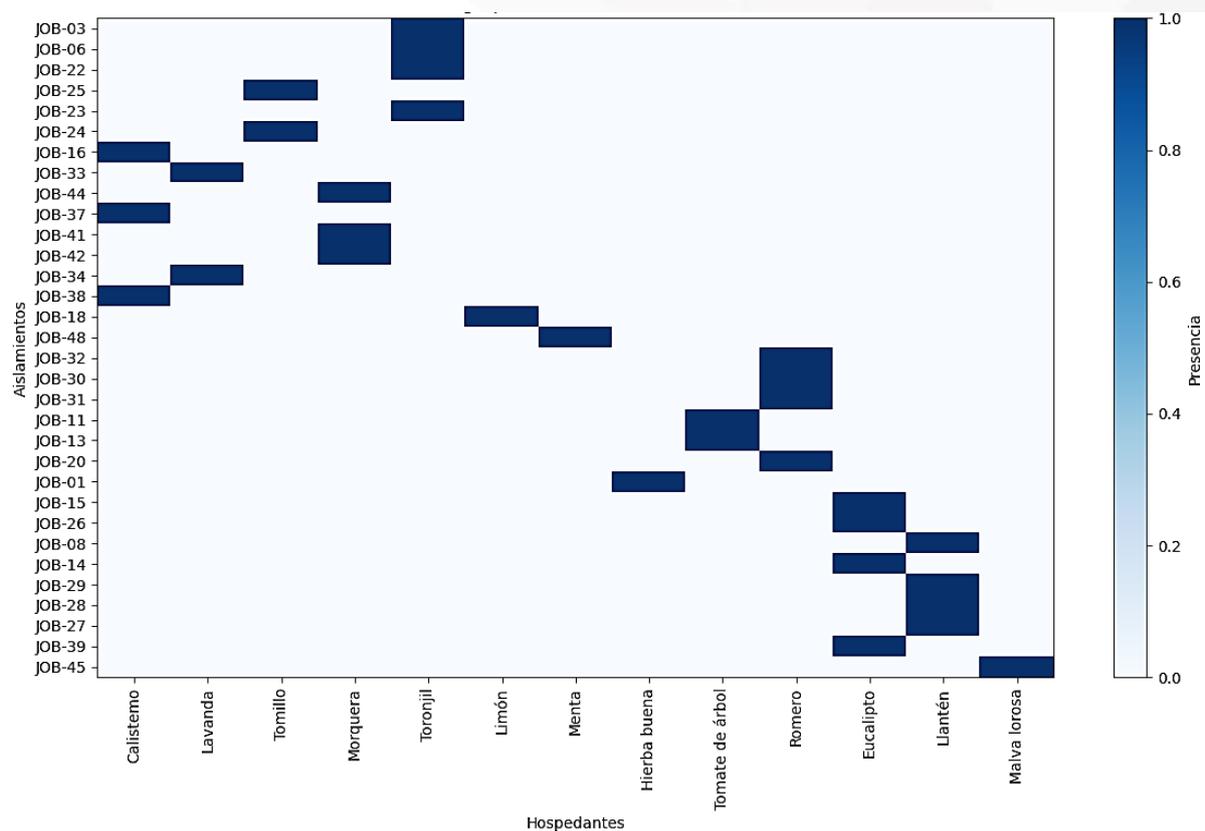
Figura 6: *Análisis de agrupamiento jerárquico utilizando el índice de similitud Gower y el método Complete Linkage. Software PAST 4. Fuente: Autores.*



Agrupamiento bidireccional (Two-Way Cluster) y mapa de color (heatmap) de colonias bacterianas y sus características morfológicas, revelando dos grupos principales robustos A y B (100% en análisis de remuestreo (bootstrap) de 1000 iteraciones). Los patrones observados refieren que la composición química de los hospedantes vegetales actúa como un filtro selectivo para la colonización endofítica. Las plantas clasificadas en el Grupo 1, presumiblemente con menor carga de metabolitos inhibitorios, albergaron microbiomas más diversos; en contraste, aquellas con perfiles químicos defensivos más intensos (Grupo 3) tendieron a seleccionar comunidades endofíticas especializadas. El análisis jerárquico, realizado mediante el índice de similitud de Gower y el método de enlace completo en el software PAST 4, permitió organizar las muestras en dos clústeres principales (A y B) con un sólido soporte de remuestreo del 100 % (bootstrap, 1000 iteraciones), lo que refuerza la robustez de la clasificación.

Figura 7: Agrupación bidireccional de aislados fúngicos endófitos y especies vegetales

hospedantes de la ciudad de Ambato. Fuente: Autores.



La Figura 7, ilustra de manera contundente los patrones de co-ocurrencia entre los aislados fúngicos endófitos y las distintas especies vegetales hospedantes, revelando una clara especificidad o selectividad en la colonización. Los clústeres distintivos de color azul oscuro en el *heatmap* demuestran que ciertos grupos de aislados endofíticos se asocian preferentemente con conjuntos específicos de hospederos (el clúster de aislados JOB-03 a JOB-34 con Calistemo, Lavanda, Tomillo, Morquera, Toronjil; JOB-38, JOB-18, JOB-48, JOB-32 con Limón y Menta), en lugar de una distribución aleatoria, la agrupación es indicativa de que existe una interacción endófito-hospedero.

4.1 Diversidad Morfológica de la Comunidad Endofítica

El muestreo de las veinte especies vegetales hospedantes resultó en el aislamiento de una colección diversa, compuesta por un total de 81 aislados bacterianos (codificados como

BAC) y 52 aislados fúngicos (codificados como JOB). Este resultado inicial confirma la presencia ubicua y variada de comunidades endofíticas en la flora de la región estudiada. En términos morfológicos, los 81 aislados bacterianos evidenciaron una alta diversidad estructural. Las colonias mostraron márgenes ondulados o rizoides, superficies que oscilaron entre lisas y rugosas, y texturas comúnmente cerosas o cremosas.

4.1.1 Riqueza y Abundancia de Endófitos Aislados

La capacidad de cada especie vegetal para albergar endófitos varió de manera notable. El análisis de los datos de aislamiento revela que el Tomate de árbol (*Solanum betaceum*) fue el hospedante más prolífico en términos de abundancia y riqueza fúngica en el primer muestreo, con 6 colonias recuperadas que correspondían a 3 morfotipos distintos. Le siguieron en riqueza el Pataconyuyo (*Peperomia peltigera*) y el Arrayán (*Myrtus communis*), de los cuales se obtuvieron 4 morfotipos fúngicos distintos en cada caso.

La estructura jerárquica muestra que ciertas plantas tienden a albergar perfiles microbianos similares, lo que sugiere que factores específicos de cada especie vegetal como su metabolismo secundario, tipo de tejido o estrategias de defensa influyen en la composición de sus endófitos. En contraste, la recuperación de endófitos bacterianos fue más generalizada entre los hospedantes.

El Limón (*Citrus limon*) destacó por albergar la mayor riqueza bacteriana, con 5 morfotipos distintos, mientras que la Hierba Buena (*Mentha spicata*) registró la mayor abundancia con 7 colonias (ver Figura 3 para detalles).

4.1.2 Caracterización Morfológica

Aislados Fúngicos: La caracterización de los 52 aislados fúngicos reveló una considerable diversidad fenotípica. Las colonias en medio PDA exhibieron una amplia gama de texturas, predominantemente esponjosas y lisas.

Figura 8: Caracterización morfológica macro y microscópica del hongo JOB 25.

Fuente: Autores.



La producción de pigmentos fue una característica notable; por ejemplo, el aislado JOB-25 se distinguió por generar un pigmento amarillo intenso (*Golden yellow 356*) que se difundía en el sustrato, una característica valiosa para su seguimiento.

Figura 9: Caracterización morfológica macro y microscópica del hongo JOB 20.

Fuente: Autores.



Microscópicamente, la mayoría de los aislados presentaron micelio no tabicado, y la variabilidad en sus estructuras reproductivas permitió su agrupación en morfotipos únicos.

Figura 10: Caracterización morfológica macro y microscópica del *Diplobacilo Gram*

Negativo BAC-25. Fuente: Autores.



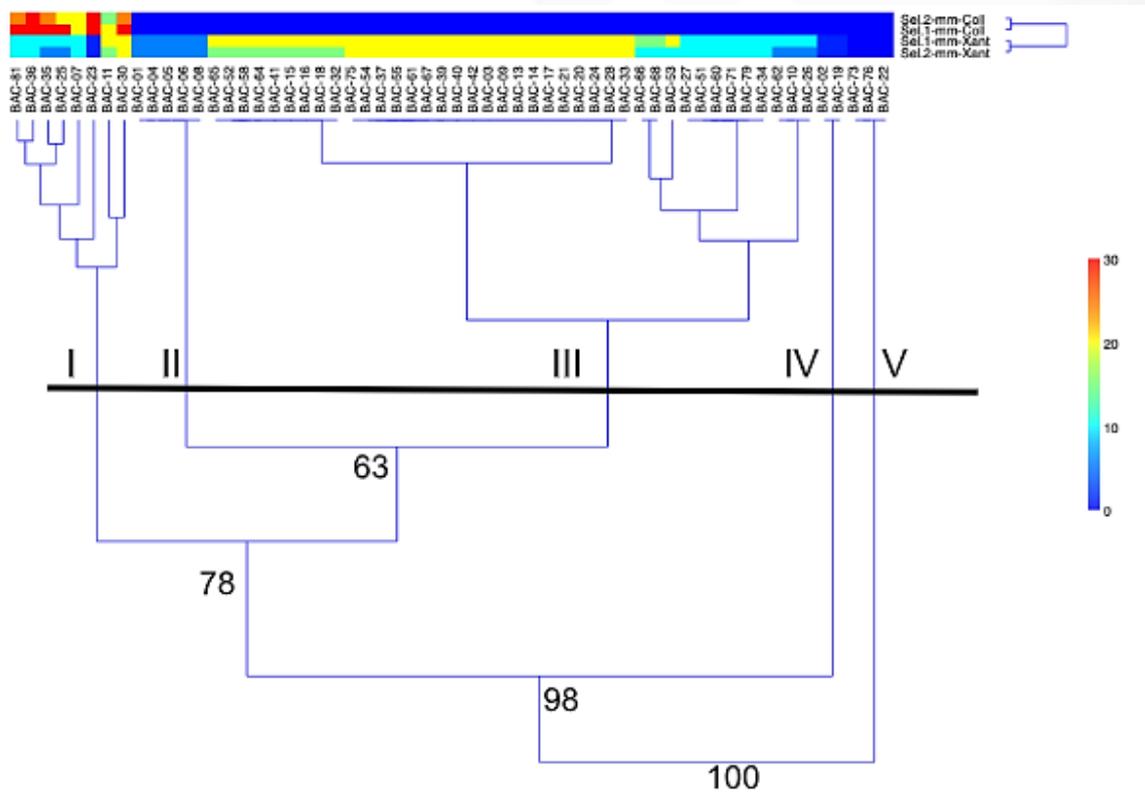
4.2 Actividad Antimicrobiana a priori

La evaluación del potencial antagonista de la colección de endófitos fue un paso crucial para identificar cepas con potencial para el biocontrol. Los resultados se presentan por separado para cada patógeno.

4.2.1 Actividad Antagonista de los aislados bacterianos frente a *Xanthomonas sp* y *Colletotrichum sp.*

La confrontación directa contra la bacteria fitopatógena reveló que un selecto grupo de endófitos poseía una potente actividad inhibitoria. Aunque muchos aislados no mostraron actividad, el hongo JOB-32, aislado de Romero (*Rosmarinus officinalis*), fue el más destacado, produciendo un halo de inhibición consistente de 20 mm en ambas réplicas del ensayo. Este nivel de inhibición es comparable al del control positivo con el antibiótico Rifampicina (20 mm). De igual manera, los aislados bacterianos BAC-39 y BAC-25, también provenientes del Romero, exhibieron una fuerte actividad antagonista, con halos de 20 mm y 10 mm, respectivamente.

Figura 11: Agrupamiento bidireccional y mapa de color de aislados bacterianos endófitos y su capacidad antagónica (halo de inhibición en mm) frente a aislados de *Colletotrichum* sp. y de *Xanthomonas* sp. Software PAST 4.



El análisis jerárquico de agrupamiento, basado en los índices de similitud de Bray-Curtis y Gower, permitió identificar cinco grupos principales (I–V) con un soporte robusto de remuestreo superior al 63 % (bootstrap, 1000 iteraciones), alcanzando el 100 % en el grupo V. Estos agrupamientos, contruidos a partir de características morfológicas macroscópicas y microscópicas, revelan una notable diversidad estructural entre los microorganismos endófitos aislados de tejidos vegetales sanos, destacando al menos dos perfiles morfológicos bien diferenciados.

Esta variabilidad se visualiza claramente en el mapa de calor correspondiente, que refleja una amplia gama de características como coloración, textura, tipo de margen,

esporulación y disposición celular, sugiriendo la coexistencia de múltiples géneros microbianos con funciones ecológicas relevantes.

Además, el análisis jerárquico de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos reveló tres agrupamientos principales según su capacidad inhibitoria frente a *Xanthomonas* y *Colletotrichum sp.*, evaluada mediante ensayos de confrontación dual. Estos clústeres mostraron soporte estadístico elevado (bootstrap hasta 100 %), y el patrón del mapa de calor evidenció una distribución heterogénea de la actividad inhibitoria, con subgrupos que expresaron acción específica frente a uno o ambos fitopatógenos. En conjunto, estos hallazgos destacan a determinados aislados y a sus plantas hospedantes como fuentes prometedoras de compuestos bioactivos con potencial aplicación en estrategias sostenibles de control biológico.

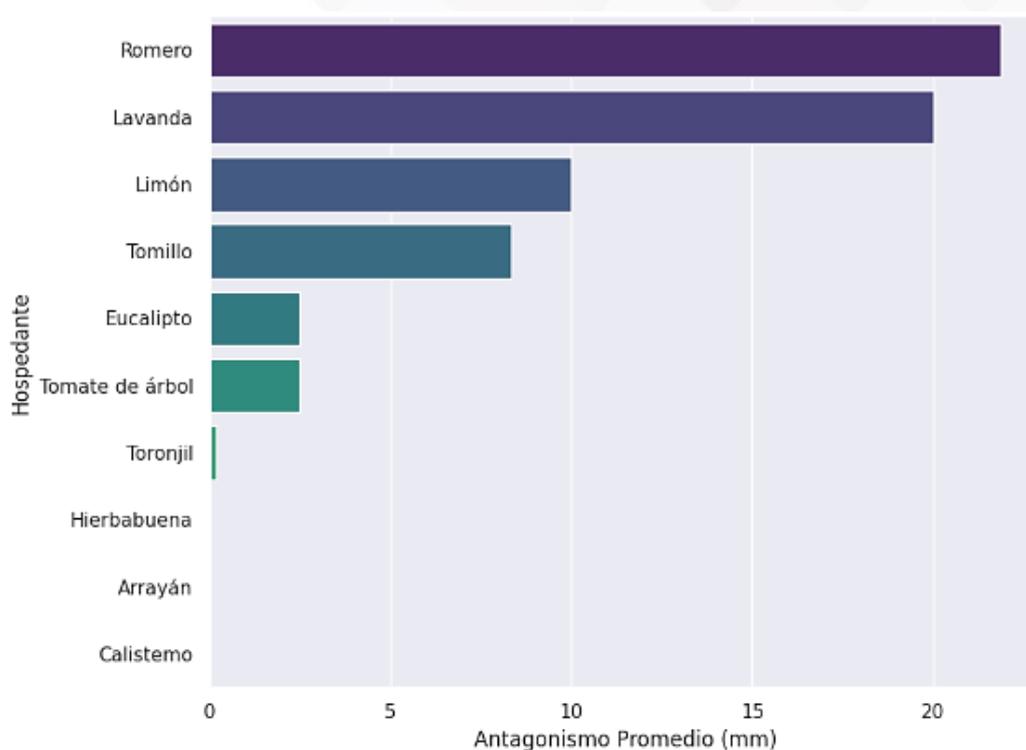
4.2.2 Actividad Antagonista de los aislados fúngicos frente a *Xanthomonas sp* y *Colletotrichum sp.*

La actividad inhibitoria contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum sp.* fue más pronunciada y estuvo distribuida en un mayor número de aislados. Varios aislados demostraron una potente actividad antifúngica, destacando los hongos JOB-22 (de Toronjil) y JOB-25 (de Tomillo), con halos de inhibición de 30 mm y 25 mm, respectivamente.

Es de particular interés el aislado bacteriano BAC-25 (de Romero), que no solo fue efectivo contra *Xanthomonas sp.*, sino que también produjo uno de los mayores halos de inhibición contra *Colletotrichum sp.* (30 mm).

Este hallazgo es de gran relevancia, ya que identifica a BAC-25 como un antagonista de amplio espectro, con la capacidad de inhibir tanto a patógenos bacterianos como fúngicos. Con base en estos resultados cuantitativos, los aislados BAC-25, JOB-32 y JOB-25 fueron seleccionados por su potente y/o de amplio espectro actividad para los estudios subsecuentes.

Figura 12: Top diez hospedantes por antagonismo promedio total. Fuente Autores.



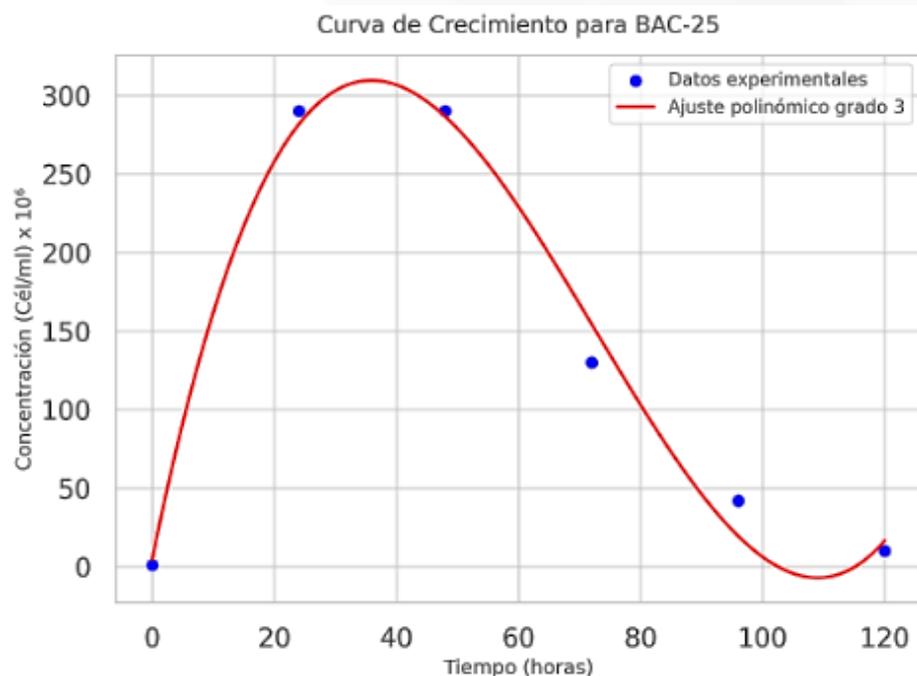
4.3 Cinética de producción de metabolitos en aislados promisorios

Para determinar los tiempos óptimos de producción de metabolitos secundarios, se evaluó la cinética de crecimiento de tres aislados con alto potencial antagonista: BAC-25, JOB-20 y JOB-25. Para ello, la estimación de la densidad celular se realizó mediante la siguiente fórmula ajustada:

$$\text{UFC/mL} = \text{VN} \times \text{FD}$$

- N: Número de colonias contadas en la placa.
- V: Volumen sembrado (en mL).
- FD: Factor de dilución (el inverso de la dilución realizada, por ejemplo, 10^4 si sembraste de una dilución 1:10,000).

Figura 13: Curva de crecimiento del aislado BAC-25, ajustada mediante un polinomio de grado 3. Fuente: Autores.

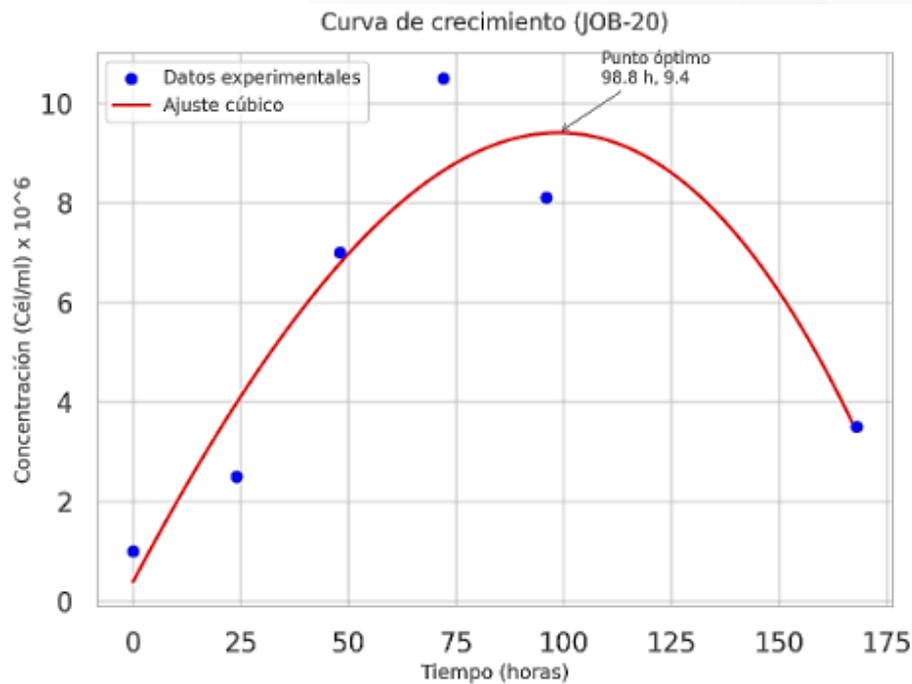


El aislado BAC-25 mostró una curva de crecimiento típica de bacterias de alta tasa replicativa, destacándose por una fase de latencia breve seguida de una rápida fase exponencial. En las primeras 24 horas, la concentración celular aumentó de $\sim 1,0 \times 10^6$ cél/mL a aproximadamente $3,0 \times 10^8$ cél/mL, reflejando una eficaz adaptación al medio de cultivo y una alta eficiencia metabólica.

La cinética observada respalda el potencial biotecnológico del aislado BAC-25 para la producción rápida y eficiente de compuestos bioactivos, especialmente dentro de una ventana metabólica óptima comprendida entre las 24 y 48 horas de cultivo. Durante este intervalo, el crecimiento celular alcanzó su máxima densidad ($\sim 3,0 \times 10^8$ cél/mL), manteniéndose en fase estacionaria sin variaciones significativas, lo cual indica condiciones fisicoquímicas favorables para la estabilidad metabólica. A partir de las 72 horas se evidenció una fase de declive progresivo, alcanzando valores cercanos a $9,0 \times 10^6$ cél/mL a las 120 horas, posiblemente debido al agotamiento de nutrientes esenciales y a la acumulación de metabolitos secundarios o productos de desecho con efectos tóxicos sobre el cultivo.

Figura 14: Curva de crecimiento del aislado fúngico JOB-20 durante 168 horas de cultivo.

Fuente: Autores.



Los datos muestran un crecimiento progresivo desde las 0 hasta las 72 horas, alcanzando un máximo de 10.50×10^6 cél/mL, confirmando la fase exponencial sostenida. A diferencia del patrón bacteriano, este aislado presenta una dinámica más prolongada, con un ligero descenso a las 96 horas, aunque aún mantiene una biomasa elevada (9.00×10^6 cél/mL), lo cual podría indicar una prolongación en la producción de metabolitos. Posteriormente, a las 168 horas, el valor promedio se reduce a 4.00×10^6 cél/mL, marcando la entrada a la fase de declive. Esta distribución de datos evidencia un crecimiento fúngico de tipo multimodal, en el que el segundo pico leve podría reflejar un metabolismo secundario activado por la disponibilidad de nutrientes residuales o por la autorregulación de su entorno.

La figura 14 respalda este comportamiento, mostrando un incremento abrupto en la biomasa durante las primeras 24 horas, y estabilidad relativa hasta las 48 horas. A partir de ese punto, se registra una disminución sostenida en la concentración celular, con una caída pronunciada a las 120 horas ($\sim 9,03 \times 10^6$ cél/mL), los datos de la cinética de crecimiento

indican que el intervalo entre las 24 y 48 horas constituye el pico metabólico ideal para la recolección de metabolitos de interés.

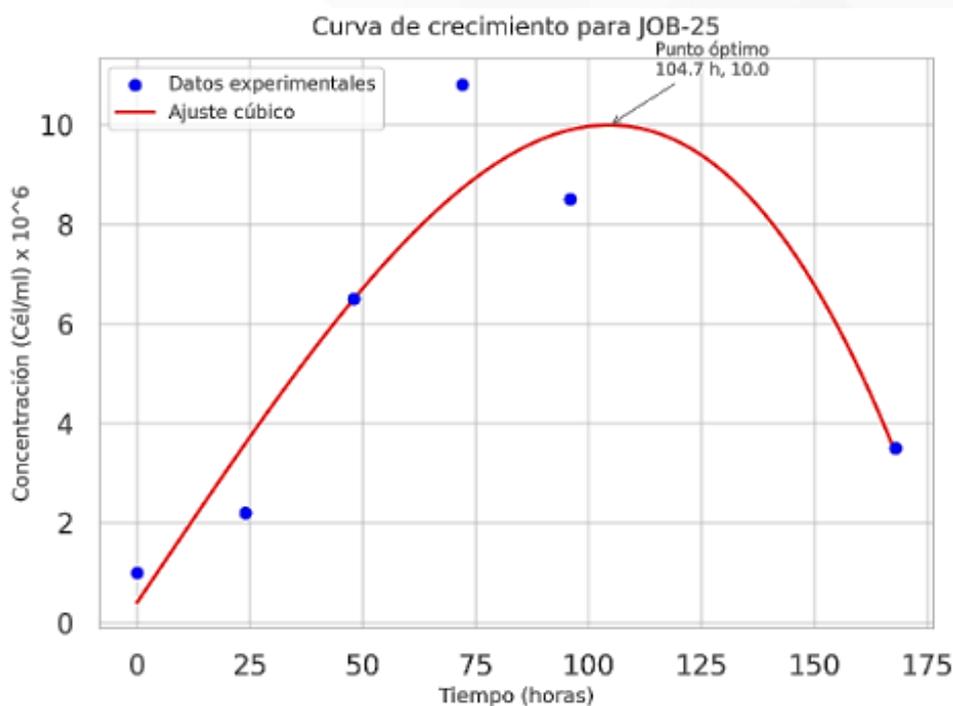
El patrón de crecimiento del aislado fúngico JOB-20 mostró una dinámica más lenta y compleja en comparación con el aislado bacteriano BAC-25, lo cual sugiere una cinética influenciada por múltiples fases metabólicas. Los datos experimentales (puntos azules), presentados en la Figura 12, evidencian una fase inicial de adaptación y crecimiento lento, seguida de una fase logarítmica sostenida, alcanzando un pico de concentración de aproximadamente $10,8 \times 10^6$ células/mL a las 75 horas de cultivo. Posteriormente, se identifica una fase de declive, indicativa de una reducción en la viabilidad celular.

El modelo de ajuste cúbico (línea roja) describe esta dinámica no lineal, proyectando un punto óptimo de concentración de $9,4 \times 10^6$ células/mL a las 98,8 horas, lo que sugiere una fase estacionaria prolongada previa al descenso definitivo.

Esta curva, de naturaleza sigmoideal, es característica del crecimiento microbiano en sistemas discontinuos (batch), donde la disponibilidad de nutrientes y la acumulación de metabolitos limitan el desarrollo poblacional. Desde una concentración basal de $\sim 1,0 \times 10^6$ cél/mL, JOB-20 alcanzó un primer pico a las 48 horas ($7,0 \times 10^6$ cél/mL), y posteriormente su máximo absoluto a las 72 horas ($10,5 \times 10^6$ cél/mL).

A las 96 horas, se observó un leve descenso, seguido de un segundo aumento discreto de biomasa, lo que sugiere una reactivación transitoria del metabolismo, posiblemente mediada por el aprovechamiento de metabolitos secundarios acumulados. Finalmente, entre las 120 y 168 horas, la biomasa disminuyó progresivamente hasta alcanzar valores cercanos a $4,0 \times 10^6$ cél/mL, indicando la entrada definitiva en fase de decaimiento.

Figura 15: Curva de crecimiento del aislado fúngico JOB-25. Fuente: Autores.



Aislado Fúngico JOB-25. Tras una fase de latencia prolongada, su crecimiento exponencial se extendió hasta las 72 horas, alcanzando una fase estacionaria sostenida y una densidad celular máxima (aprox. 1.0×10^7 cél/mL) entre las 72 y 96 horas de cultivo. Este aislado presentó una cinética de crecimiento más lenta, lo que es coherente con su fisiología eucariota y probablemente con un metabolismo especializado. La fase de latencia fue más prolongada, con un crecimiento limitado en las primeras 24 horas ($\approx 2,2 \times 10^6$ cél/mL), lo que sugiere una adaptación inicial más conservadora al medio. El crecimiento se mantuvo en fase exponencial hasta las 72 horas, alcanzando una densidad media de $10,8 \times 10^6$ cél/mL, seguida de una fase estacionaria sostenida entre las 72 y 96 horas.

A partir de las 96 horas se observa un descenso progresivo, hasta llegar a $3,5 \times 10^6$ cél/mL a las 168 horas. Este patrón indica que la ventana óptima para la recolección de metabolitos podría situarse entre las 72 y 96 horas, donde se observa la mayor acumulación celular sin señales marcadas de declive.

CAPÍTULO V: Discusión, Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Discusión

La presente investigación, centrada en endófitos aislados de la región interandina de Ecuador para combatir *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.*, se alinea con el creciente reconocimiento del vasto potencial de estos microorganismos como fuentes de metabolitos secundarios bioactivos. Revisiones sistemáticas recientes, como la de Ntemafack et al. (2023), destacan que géneros como *Rumex* y otras plantas medicinales son "grandes reservorios" de diversidad fúngica y bacteriana endofítica. De hecho, la biodiversidad vegetal en general constituye un recurso inmenso para el aislamiento de nuevas especies de endófitos. Estos microorganismos habitan inofensivamente dentro de los tejidos vegetales y se ha reportado que protegen a su hospedero contra patógenos e insectos.

Específicamente, más de 80 especies fúngicas endófitas poseen efectos antimicrobianos, anticancerígenos, antidiabéticos, antioxidantes, antimaláricos, antivirales y antifúngicos, y se han reportado más de 300 compuestos con actividad antimicrobiana derivados de bacterias y hongos endófitos (Hernández et al., 2019). Ejemplos concretos incluyen la producción de fusarinas C y D por cepas de *Fusarium oxysporum*, la actividad antibacteriana de *Epicoccum nigrum*, y el potencial de biocontrol de actinobacterias endófitas contra *Fusarium solani* y *Phytophthora megakarya* (Castillo et al., 2021). Por lo tanto, los endófitos aislados en la región interandina de Ecuador, en consonancia con estas observaciones, poseen un considerable potencial para el desarrollo de estrategias de biocontrol contra patógenos fitobacterianos como *Xanthomonas sp.* y fitopatógenos fúngicos como *Colletotrichum sp.*, gracias a su capacidad para producir compuestos con diversas actividades antimicrobianas y antifúngicas.

La caracterización morfológica de los endófitos aislados reveló una diversidad fenotípica significativa, con la predominancia de bacilos Gram-negativos entre las bacterias. Este hallazgo es particularmente relevante al considerar que *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CaLso), el patógeno asociado con *Bactericera cockerelli*, es también una bacteria Gram-negativa. Como mencionan Castillo et al. (2021), esta similitud filogenética sugiere posibles mecanismos de competencia interespecífica o interacciones complejas dentro del nicho endofítico, donde los endófitos beneficiosos podrían mitigar la proliferación o el impacto de CaLso.

Aunque la biorremediación de patógenos internos de plantas no se describe directamente en todas las fuentes, se destaca consistentemente la capacidad de los endófitos para proteger a la planta hospedera contra microorganismos patógenos. En consecuencia, la diversidad de endófitos Gram-negativos identificados en la región interandina de Ecuador ofrece un modelo prometedor para futuras investigaciones orientadas a desarrollar estrategias biotecnológicas que promuevan la resistencia o tolerancia de las plantas hospedantes contra *Candidatus Liberibacter solanacearum* a través de la modulación del endofitoma para la protección vegetal.

Los resultados del cribado antimicrobiano fueron particularmente relevantes para el desarrollo de soluciones de biocontrol. Frente a *Xanthomonas sp.*, el hongo JOB-32 exhibió una notable inhibición de 20 mm, comparable a la Rifampicina, destacando la eficacia de los compuestos naturales producidos por endófitos nativos. De manera similar, la acción de BAC-39 y BAC-25, ambos aislados de *Rosmarinus officinalis*, sugiere una coevolución del microbioma endofítico de esta planta medicinal, potenciando sus defensas químicas intrínsecas contra patógenos. Frente a *Colletotrichum sp.*, los aislados JOB-22 y JOB-25 demostraron una actividad antifúngica sobresaliente. El hallazgo más estratégico fue la identificación de BAC-

25 como un antagonista de amplio espectro, con capacidad para inhibir tanto a *Xanthomonas sp.* (10 mm) como a *Colletotrichum sp.* (30 mm).

Este perfil de doble acción ofrece una ventaja significativa para el diseño de bioinsumos con efectos combinados sobre patógenos bacterianos y fúngicos, lo que podría reducir costos y mejorar sustancialmente la eficacia del control en campo, optimizando el manejo de enfermedades en cultivos. El estudio de la cinética de crecimiento en cultivo líquido proporcionó datos cruciales para la futura producción a escala y la optimización de protocolos de fermentación. BAC-25 mostró una fase exponencial rápida y una fase estacionaria temprana (24 a 48 horas), un perfil de crecimiento ideal para procesos industriales de ciclo corto y producción masiva eficiente de biomasa o metabolitos asociados al crecimiento primario.

En contraste, los hongos JOB-20 y JOB-25 presentaron curvas de crecimiento más prolongadas y complejas (ver Figura 14 para JOB-20), con patrones bimodales y fases estacionarias extendidas, donde el punto óptimo de concentración celular para JOB-20 fue alcanzado a las 98.8 horas con un ajuste cúbico. Estos patrones pueden asociarse a estrategias metabólicas diferenciadas, cruciales para la producción de compuestos secundarios.

Las diferencias fisiológicas inherentes entre bacterias y hongos inciden directamente en los parámetros de cultivo y los intervalos óptimos para la recolección de metabolitos; mientras BAC-25 alcanza su máximo potencial en 24-48 horas, los hongos como JOB-20 y JOB-25 requieren intervalos más amplios (72-96 horas o incluso más, como se evidencia en la curva de JOB-20) para alcanzar su máximo potencial metabólico. Este aspecto es vital, ya que el manejo más sostenible de los hongos poscosecha, como *C. gloeosporioides*, a menudo involucra el uso de microorganismos antagónicos y biopolímeros, siendo una gran alternativa de biorremediación, como señalan Peralta et al. (2023). Esto subraya la necesidad de

comprender la dinámica de crecimiento de los endófitos para optimizar la producción de agentes de biocontrol.

La integración de la microbiología clásica, pruebas funcionales in vitro y análisis cinético de crecimiento establece una base científica sólida para el desarrollo futuro de biocontroladores autóctonos en Ecuador. Estas herramientas biológicas ofrecen implicaciones directas para la sostenibilidad agrícola en regiones afectadas por Lso y otros patógenos, promoviendo alternativas ecológicas y eficientes para el manejo de enfermedades. Esto es fundamental dada la imperante necesidad de desarrollar soluciones sostenibles para controlar estos patógenos, como lo destacan Manobanda et al. (2022) en su investigación focalizada en Tungurahua.

5.2 Conclusiones

La flora endémica de Ambato, Ecuador, constituye un reservorio microbiano de excepcional valor para aplicaciones agrícolas. Se logró el aislamiento exitoso de 133 cepas endofíticas (81 bacterianas y 52 fúngicas) de veinte especies vegetales sanas, lo que confirma la notable riqueza microbiana de los ecosistemas altoandinos.

Las características morfológicas de los aislados evidenciaron una diversidad taxonómica y funcional relevante. La caracterización reveló una amplia variedad de morfotipos, predominando bacilos Gram-negativos entre las bacterias y morfotipos fúngicos con esporulación heterogénea. Esta heterogeneidad fenotípica, manifestada en diversas texturas, pigmentaciones y márgenes, sugiere una intrínseca diversidad metabólica asociada a distintos mecanismos de antagonismo. Este criterio morfológico fue crucial para la selección de cepas únicas para ensayos funcionales, fundamentándose en la premisa de que la variabilidad fenotípica se correlaciona directamente con una mayor amplitud funcional y adaptativa.

Los microorganismos endófitos nativos, provenientes de la flora de Ambato, poseen una actividad antagonista significativa y reproducible frente a fitopatógenos clave. Los ensayos de confrontación in vitro demostraron consistentemente que múltiples cepas de la colección son capaces de inhibir eficazmente el crecimiento de *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.* Esta actividad antimicrobiana, ampliamente distribuida dentro de la comunidad endofítica, refuerza el enfoque de la bioprospección como una vía eficaz y sostenible para el hallazgo de agentes de control biológico adaptados localmente.

Se identificaron tres aislados élite con perfiles de antagonismo superiores, que ofrecen aplicaciones diferenciadas según el patógeno objetivo y representan candidatos prometedores para bioinsumos. El análisis cuantitativo de los halos de inhibición permitió la selección de:

BAC-25 (bacteria). Aislado de *Rosmarinus officinalis*, exhibió una inhibición dual de 10 mm contra *Xanthomonas sp.* y 30 mm frente a *Colletotrichum sp.*, evidenciando un valioso espectro de acción amplio para estrategias de biocontrol integral.

JOB-32 (hongo). También aislado de *Rosmarinus officinalis*, generó un notable halo de 20 mm frente a *Xanthomonas sp.*, demostrando una eficacia comparable al antibiótico de referencia (Rifampicina) y posicionándolo como un potente candidato contra enfermedades bacterianas.

JOB-25 (hongo). Proveniente de *Thymus vulgaris*, mostró una fuerte inhibición de 25 mm contra *Colletotrichum sp.*, confirmando su rol como especialista antifúngico para el control de la antracnosis.

El estudio detallado de la cinética de crecimiento de los aislados superiores proporciona información crucial para su escalamiento industrial y la optimización de bioprocesos. La dinámica de crecimiento en medio líquido reveló comportamientos fisiológicos diferenciados entre bacterias y hongos. BAC-25 mostró una proliferación rápida y una fase estacionaria breve

(24–48 h), características ideales para bioprocesos de ciclo corto y producción masiva eficiente. Por el contrario, los hongos JOB-20 y JOB-25 presentaron curvas de crecimiento prolongadas y complejas, con patrones bimodales y fases estacionarias extendidas (como ilustra la Figura 14 para JOB-20), donde el punto óptimo de concentración celular fue alcanzado considerablemente más tarde.

Este comportamiento resalta la necesidad crítica de una monitorización más extensa en cultivos fúngicos, ya que la acumulación de metabolitos de interés, particularmente los secundarios, podría coincidir con un segundo pico de crecimiento o fases avanzadas, observadas incluso hasta las 96 horas. La fase de decaimiento en ambas cepas fúngicas a las 168 horas delimita la ventana efectiva de cosecha, subrayando la importancia de ajustar los tiempos de fermentación para maximizar el rendimiento de biomasa y metabolitos bioactivos.

La presente investigación ha establecido una base metodológica robusta y reproducible para el desarrollo de bioinsumos nativos en Ecuador. Los resultados obtenidos, que abarcan desde el aislamiento y la caracterización morfológica hasta la evaluación funcional *in vitro* y el análisis cinético de crecimiento, confirman la viabilidad técnica y científica para el diseño de bioproductos basados en endófitos locales. La información generada es fundamental para la formulación precisa de estrategias de cultivo, la selección de cepas líderes con perfiles prometedores y la planificación de ensayos futuros tanto en condiciones controladas como de campo, consolidando el aporte de esta investigación hacia una agricultura más sostenible, basada en el aprovechamiento racional y estratégico de la vasta biodiversidad microbiana ecuatoriana.

5.3 Recomendaciones

A partir de los hallazgos obtenidos y el análisis crítico del presente trabajo, se proponen las siguientes recomendaciones para fortalecer la investigación futura y facilitar la aplicación práctica de los resultados:

Identificación Taxonómica y Químico-Biológica: Es prioritario realizar la secuenciación de genes marcadores específicos (16S rRNA para bacterias y región ITS para hongos) para determinar la identidad taxonómica precisa de los aislados élite (BAC-25, JOB-25 y JOB-32). Paralelamente, se recomienda la purificación y caracterización de los compuestos responsables de la actividad antagonista mediante técnicas cromatográficas (HPLC, GC-MS) y espectroscópicas (UV-Vis, RMN). Esta aproximación es esencial para establecer la seguridad, evaluar posibles aplicaciones biotecnológicas, comprender el modo de acción y determinar el valor agronómico de las moléculas bioactivas.

Validación en Condiciones Reales y Mecanismos de Acción: Se sugiere implementar ensayos rigurosos bajo condiciones de invernadero y, posteriormente, en campo, utilizando cultivos hospedantes como papa y tomate. Estas pruebas permitirán evaluar la capacidad de los aislados para colonizar la rizosfera o el tejido vegetal, y para ofrecer protección efectiva frente a patógenos en ambientes complejos. Adicionalmente, es crucial investigar los mecanismos de acción subyacentes, incluyendo la competencia por nutrientes, la producción de enzimas líticas, el micoparasitismo, y la inducción de respuestas de defensa sistémicas en la planta hospedera, lo que ampliará la comprensión funcional del biocontrol ejercido.

Optimización de Bioprocesos y Formulación: Es conveniente desarrollar estudios de fermentación a escala para definir las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas líderes, con el fin de maximizar la producción de biomasa y/o metabolitos de interés.

Expansión de la Bioprospección: Dado el éxito de esta exploración inicial en Ambato, se recomienda extender la bioprospección a otros ecosistemas andinos del Ecuador. El enfoque debe centrarse en especies vegetales nativas o subutilizadas que podrían albergar microbiomas endofíticos aún inexplorados, ampliando así significativamente el banco de recursos microbianos del país y su potencial biotecnológico.

Evaluación Restringida a Nivel *in vitro*: Los ensayos funcionales se limitaron a condiciones controladas de laboratorio. Aunque esta fase es crucial para un primer cribado funcional, los resultados *in vitro* no siempre se correlacionan directamente con la eficacia en campo. Esto se debe a la complejidad de los factores edáficos, climáticos, microbiológicos y las interacciones planta-microorganismo-patógeno presentes en ambientes naturales, que no pueden ser completamente replicados en el laboratorio.

Uso de Patógenos Modelo: Se emplearon cepas representativas de *Xanthomonas sp.* y *Colletotrichum sp.* como organismos objetivo. No obstante, la eficacia contra el patógeno de interés primario, *Candidatus Liberibacter solanacearum*, no pudo ser evaluada directamente debido a su naturaleza no cultivable. Esta es una limitación interpretativa significativa que deberá abordarse en futuras investigaciones mediante bioensayos indirectos, sistemas alternativos de validación *in vivo* o técnicas moleculares avanzadas para determinar la interacción con el patógeno real en la planta hospedera.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acaro, B., & Cevallos, S. (2025). Hongos asociados al cultivo de banano (*Musa spp.*) con potencial biotecnológico para el desarrollo de inoculantes. *Siembra*, 12(1). doi:<https://doi.org/10.29166/siembra.v12i1.7053>
- Adeleke, B., & Babalola, O. (2021). Visión biotecnológica de hongos endófitos de importancia agrícola. (H. M. Biotecnología, Ed.) *Springer Nature Link*, 62, 507–520. doi:<https://doi.org/10.1007/s13580-021-00334-1>
- Adeleke, S., Ayilara, M., Akinola, A., & Babalola, O. (2022). Mecanismos de biocontrol de hongos endófitos. *Revista Egipcia de Control Biológico de Plagas. Springer Revista Egipcia de Control Biológico de Plagas*, 32(1), 46. doi:<https://doi.org/10.1186/s41938-022-00547-1>
- Agrawal, S., & Bhatt, A. (2023). Endófitos microbianos: tendencias emergentes y aplicaciones biotecnológicas. *Springer Nature Link*, 80(249). doi:<https://doi.org/10.1007/s00284-023-03349-2>
- Bratcher, J. (2021). *Aislamiento de hongos endófitos foliares y fitopatógenos en cinco árboles de la reserva forestal Montuoso provincia de Herrera*. Doctoral dissertation, Universidad de Panamá. Obtenido de <http://up-rid.up.ac.pa/id/eprint/6631>
- British Standard BS 381C:1996 Colour. *e-paint*. Obtenido de colour data, charts and samples: https://www.e-paint.co.uk/BS381-colour-chart.asp#google_vignette
- Castillo, C., & Llumiquinga, P. (Julio de 2021). *Manual Técnico No. 121: Manual para reconocer e identificar al psílido de la papa (Bactericera cockerelli Šulc) en campo y laboratorio*. (E. I.-E. Quito, Ed.) Obtenido de INIAP MANUAL TECNICO N121 - MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA: <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5781>
- Dofuor, A., Quartey, K., O. F., Antwi, A., Asante, K., Boateng, B., & N. K. (2023). Enfermedad de la antracnosis del mango: situación actual y dirección para futuras investigaciones. *Fronteras de la Microbiología*, 14, 1168203. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1168203>
- Dofuor, A., Quartey, N., Osabutey, A., Antwi, A., Asante, K., Boateng, B., & Ninsin, D. (2023). Enfermedad de la antracnosis del mango: situación actual y dirección para futuras investigaciones. *Frontiers*, 14, 1168203. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1168203>

- dos Reis, J., Lorenzi, A., & do Vale, M. (2022). Métodos utilizados para el estudio de los hongos endófitos: una revisión sobre metodologías y desafíos, y consejos asociados. *Arch Microbiol*, <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03283-0>. doi:204, 675 (2022)
- Gaurav, P., Samiksha, S., Kanchan, K., Anand, V., Pramod, K., Sahu, . . . Verma, K. (2022). Burkholderia endófitas: Funciones multifuncionales en la promoción del crecimiento de las plantas y la tolerancia al estrés. *Sciencedirect*, 265(127201). doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127201>
- Giovanardi, D., Biondi, E., Biondo, N., Quiroga, N., Modica, F., Puopolo, G., & Pérez, S. (2025). Estrategias de control biológico sostenibles e innovadoras frente a *Pseudomonas syringae* pv. tomate, *Pseudomonas savastanoi* pv. Phaseolicola y *Xanthomonas* spp. afectando a los cultivos hortícolas. 16. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1536152>
- Guevara-Suárez, M. C.-K. (2022). Complejos de especies de *Colletotrichum* asociados con cultivos en el norte de América del Sur. (Agronomy, Ed.) *MDPI*, 12(3). doi:<https://doi.org/10.3390/agronomy12030548>
- Guha, T., & Mandal, B. (2024). El progreso reciente en el papel de las bacterias endofíticas de semillas como microorganismos promotores del crecimiento de plantas y agentes de biocontrol. (W. J. Biotechnol, Ed.) *Springer Nature Link*, 40, 218. doi:<https://doi.org/10.1007/s11274-024-04031-w>
- Gupta, S., & Saxena, S. (2023). Salvadores de las manzanas de los patógenos fúngicos postcosecha. *Sciencedirect*, 182. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105234>
- Hammond, J., Huang, Q., Jordan, R., Meekes, E., Fox, A., Vazquez, I., & Delmiglio, C. (2023). Comercio internacional y efectos locales de enfermedades virales y bacterianas en plantas ornamentales. *Annual Review of Phytopathology*, 61(1), 73-95. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021621-114618>
- Hernández, J., Ramírez, C., Molina, T., Guillén, C., Rodríguez, H., Hernández, C., . . . Valenzuela, S. (2019). Efectos de la herbivoría de *Bactericera cockerelli* en las emisiones volátiles de tres variedades de *Solanum lycopersicum*. *MDPI Plants*, 8(11), 509. doi:<https://doi.org/10.3390/plants8110509>
- INFOSTAT. (2020). SOFTWARE ESTADISTICO VERSION ESTUDIANTIL . Obtenido de <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=37>

- Insuasti, E., Suárez, V., Mena, A., Pila, O., Fiallos, X., Dahoumane, A., & Alexis, F. (2022). Biomateriales naturales de la biodiversidad para aplicaciones en salud. *Adv. Healthcare Mater*, 11(1), 2101389. doi:<https://doi.org/10.1002/adhm.202101389>
- Kashyap, N., Singh, S., Yadav, N., Singh, V., Kumari, M., Kumar, D., . . . Kumar, A. (2023). Cribado biocontrol de endófitos: aplicaciones y limitaciones. *MDPI Plants*, 12, 2480. doi:<https://doi.org/10.3390/plants12132480>
- Manobanda, M., López, P., & Vásquez, C. (2022). Bioecología de *Bactericera cockerelli* (Sulc.) en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en las provincias de Tungurahua y Cotopaxi, Ecuador. *Investigación agraria*, 24(2), 70-80. doi:<https://dx.doi.org/10.18004/investig.agrar.2022.diciembre.2402707>
- Mendoza, E., Rangel, E., Gómez, A., Velázquez, R., Torres, R., & Castro, J. (2025). Uso Efectivo de Alternativas Microbianas y de Plantas en el Control de Patógenos del Tomate: Una Revisión Exhaustiva. *Plant Pathology*, 74(5), 1171-1186. doi:<https://doi.org/10.1111/ppa.14085>
- Mora, V. R., Damaj, B., Irigoyen, S., Ancona, V., Ibanez, F., & Mandadi, K. (2021). Chip de cebrá de patata: Una visión general de la enfermedad, estrategias de control y perspectivas. *Frontiers in Microbiology*, 12. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.700663>
- Nakayinga, R., Makumi, A., Tumuhaise, V., & Tinzaara, W. (2021). Bacteriófagos de *Xanthomonas*: una revisión de su biología y aplicaciones de biocontrol en la agricultura. *BMC Microbiol*, 21, 291. doi:<https://doi.org/10.1186/s12866-021-02351-7>
- Ntemafack, A., Ali, S., Dzelamonyuy, A., Manhas, S., Atsafack, S., Kuate, R., & Chaubey, A. (2023). Perfil químico, potencial biológico, bioprospección y aplicación biotecnológica de endófitos de *Rumex*: Una revisión sistemática. *Sciencedirect*, 195, 116474. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116474>
- Pedraza, A., Sánchez, F., Arias, V., Moreno, F., & Sánchez, C. (2022). Enfermedades de las plantas emergentes y reemergentes en América Latina: una revisión. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 13(2). doi:<https://doi.org/10.22490/21456453.4639>
- Peralta, Y., Rossi, C., Grande, C., & Chaves, C. (2023). Manejo verde de la antracnosis poscosecha causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. (R. d. hongos, Ed.) *MDPI*, 9(6), 623. doi:<https://doi.org/10.3390/jof9060623>

- Rodríguez, D., Zambrano, L., Pereira, S., Torres, A., & Murillo, A. (2023). Reproducción de *Lupinus mutabilis* en los Andes de Ecuador, Perú y Bolivia. *MDPI Agronomy*, 14(1), 94. doi:<https://doi.org/10.3390/agronomy14010094>
- Roque, A., Beltrán, M., Ochoa, F., & Delgado, J. (2024). Parámetros poblacionales de *Bactericera cockerelli* en plantas de tomate tratadas con menadiona. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 15(4). doi:<https://doi.org/10.29312/remexca.v15i4.3349>
- Shi, X., Wang, S., Duan, X., Wang, Y., Liu, F., & Laborda, P. (2021). Estrategias de biocontrol para el manejo de especies de *Colletotrichum* en frutas de poscosecha. *Crop Protection*, 141, 105454. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105454>
- Singh, V., & Kumar, A. (2023). Metabolitos secundarios de hongos endófitos: producción, métodos de análisis y potencial farmacéutico diverso. (S. 90, Ed.) *Springer Nature Link*, 111–125. doi:<https://doi.org/10.1007/s13199-023-00925-9>
- Tan, G. H. (2023). Principales enfermedades fúngicas postcosecha de la papaya: Métodos de diagnóstico actuales y prospectivos. *Crop Protection*, 174, 106399. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106399>
- Toppo, P., Subba, R., Roy, K., Mukherjee, S., & Mathur, P. (2023). Elucidando las estrategias para el aislamiento de hongos endófitos y sus atributos funcionales para la regulación del crecimiento de las plantas y la resiliencia al estrés. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(3), 1342-1363. doi:<https://doi.org/10.1007/s00344-022-10638-w>
- Tripathi, L., Ntui, O., & Tripathi, J. (2022). Control de enfermedades bacterianas del banano utilizando la edición genética basada en CRISPR/Cas. *MDPI International Journal of Molecular Sciences*, 23, 3619. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms23073619>
- Valle, V., Ríos, C., & Hernández, M. (2022). Daño causado por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de chile Ancho y Mirasol en Zacatecas, México. (J. o. Agrofaz, Ed.) *Dialnet*, 4(1), 3-7. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8708015>
- Wenninger, E., & Rashed, A. (2024). Biología, ecología y manejo del psílido de la patata, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), y la enfermedad de la papa raya en la batata. *Annual Review of Entomology*, 69(1), 139-157. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020123-014734>

UNEMI
UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

