



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:

Efecto de metabolitos secundarios de *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* en el crecimiento de patógenos de banano (*Musa sp.*)

AUTOR:

Adriana Gabriela Vinuesa Villarés

TUTOR:

Dr. Simón Pérez-Martínez

Milagro, 2024

Derechos de Autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Adriana Gabriela Vinueza Villares**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación **de Promoción del Desarrollo Económico: Economía Verde** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo 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, autorizo 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.

El autor declara 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, octubre del 2024

Adriana Gabriela Vinueza Villarés

C.I.: 1804136719

Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Simón Pérez-Martínez**, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Adriana Gabriela Vinueza Villares**, cuyo tema es **Efecto de metabolitos secundarios de *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* en el crecimiento de patógenos de banano (*Musa sp.*)**, que aporta a la Línea de Investigación **Promoción del Desarrollo Económico: Economía Verde**, 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, octubre del 2024

Dr. Simón Pérez-Martínez

C.I.: 0960298784

Certificación de Defensa

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO FACULTAD DE POSGRADO CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING VINUEZA VILLARES ADRIANA GABRIELA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EFECTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE TRICHODERMA VIRIDE Y T. HARZIANUM EN EL CRECIMIENTO DE PATÓGENOS DE BANANO (MUSA SP.)", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	59.67
SUSTENTACIÓN	38.67
PROMEDIO	98.33
EQUIVALENTE	Excelente



El presente documento pertenece a:
**LUIS EDUARDO CAGUA
MONTAÑO**

Mgs CAGUA MONTAÑO LUIS EDUARDO
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



El presente documento pertenece a:
**ALEX EDWIN GUILLEN
BONILLA**

Mae. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN
VOCAL



El presente documento pertenece a:
**SIMON ABELARDO
RAMOS MENDIETA**

Ing. RAMOS MENDIETA SIMON ABELARDO
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Dedicatoria

A Carlos por ser mi inspiración y el mejor maestro de vida.

A Victoria por ser mi fortaleza y la luz que me guía.

Agradecimientos

A la empresa Bioseorganics por facilitarme el uso de sus instalaciones.

Al Doctor Simón por ser uno de los mejores profesores de la maestría y darme el apoyo necesario en el proceso de elaboración de la tesis.

A mis colegas Lily, Gabriel y Manuel que me han apoyado para la conclusión de este trabajo.

Resumen

Trichoderma sp. es un hongo con múltiples aplicaciones biotecnológicas agrícolas, principalmente como una alternativa sostenible para el control de enfermedades de plantas y como promotor de crecimiento. Produce un gran cantidad de metabolitos secundarios inhibidores del crecimiento, esporulación y germinación de hongos patógenos. Para obtener las condiciones favorables para la producción de biomasa y metabolitos se usaron cuatro medios de fermentación. El mejor crecimiento se observó en caldo Sabouraud. Los metabolitos extraídos mediante el método de fraccionamiento por partición con disolvente fueron eficientes en el control de hongos patógenos aislados de banano (*Musa* sp.) como *Pseudocercospora* sp. y *Fusarium* sp. El enfoque de este estudio es el descubrimiento de nuevos agentes de control biológico que permitan el manejo integrado en el cultivo de banano.

Palabras clave: *Musa* sp., hongos, patógenos, identificación, *Trichoderma*, metabolitos

Abstract

Trichoderma sp. is a fungus with multiple agricultural biotechnological applications, mainly as a sustainable alternative for plant disease control and as a growth promoter. It produces a large amount of secondary metabolites that inhibit the growth, sporulation, and germination of pathogenic fungi. Four fermentation media were used to obtain favorable conditions for biomass and metabolite production. The best growth was observed in Sabouraud broth. The metabolites extracted using the solvent partitioning method were efficient in controlling pathogen fungi such as *Pseudocercospora* sp. and *Fusarium* sp. isolated from banana (*Musa* sp.). The focus of this study is the discovery of new biological control agents for integrated management in banana cultivation.

Keywords: *Musa* sp., fungal, pathogen, identification, *Trichoderma*, metabolites

Lista de Figuras

Figura 1 Partes de la planta de banano	11
Figura 2 Ciclo de desarrollo de Sigatoka	14
Figura 3 Síntomas de las seis etapas de Sigatoka negra.....	16
Figura 4 Ciclo de enfermedad de <i>Fusarium oxysporum</i>	19
Figura 5 Ciclo de infección de bacterias	20
Figura 6 Síntomas y aislamiento de <i>Pseudocercospora</i> sp.....	28
Figura 7 Síntomas y aislamiento de <i>Fusarium</i> sp.....	29
Figura 8 Síntomas y aislamiento de <i>Ralstonia</i> sp.....	30
Figura 9 Síntomas y aislamiento de <i>Erwinia</i> sp.	31
Figura 10 Diagrama que ilustra la forma, elevación y margen de las colonias bacterianas... 31	
Figura 11 Morfología de <i>Pseudocercospora</i> sp.	36
Figura 12 Morfología de <i>Fusarium</i> sp.....	37
Figura 13 Caracterización macro y microscópica de <i>Ralstonia</i> sp.....	38
Figura 14 Caracterización macro y microscópica de <i>Erwinia</i> sp.	39
Figura 15 Morfología y estructuras microscópicas de conidióforos y conidias de <i>Trichoderma harzianum</i> en placas.....	39
Figura 16 Morfología de la colonia y estructuras microscópicas de conidióforos y conidias de <i>Trichoderma viride</i>	40
Figura 17 Dinámica de la tasa de esporulación de <i>Trichoderma</i> spp. (ufc/ml) en medios líquidos a los 8 y 21 días.	41
Figura 18 Observación de clamidosporas de <i>T. harzianum</i> y <i>T. viride</i>	41
Figura 19. Separación de medias para porcentaje de inhibición de acuerdo al medio de cultivo.....	44
Figura 20 Separación de medias para la inhibición por patógeno.....	44
Figura 21 Separación de medias para las cepas de <i>Trichoderma</i>	45

Lista de Tablas

Tabla 1 Preguntas de Investigación.....	4
Tabla 2 Operacionalización de variables	7
Tabla 3 Descripción de los tratamientos para la determinación de la actividad antimicrobiana	34
Tabla 4 Descripción de los extractos para los ensayos de enzimas líticas.....	35
Tabla 5 Características culturales y morfológicas de bacterias patógenas.....	38
Tabla 6 Datos del promedio del diámetro de crecimiento y porcentaje de inhibición en los tratamientos	42
Tabla 7 ANOVA para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de por efectos de extractos de acetato de etilo.....	43
Tabla 8 Evaluación cualitativa de la actividad enzimática	46

Lista de Anexos

Anexo 1 Medios de cultivo	55
--	----

Índice / Sumario

Derechos de Autor.....	i
Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación.....	ii
Certificación de Defensa	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	ix
Lista de Anexos.....	x
Índice / Sumario.....	xi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Delimitación del problema.....	4
1.3. Formulación del problema.....	4
1.4. Preguntas de investigación.....	4
1.5. Objetivos.....	5
1.6. Justificación.....	6
1.7. Declaración de las variables (Operacionalización).....	7
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial.....	9
2.1. Antecedentes Referenciales.....	9
2.1.1. <i>Características y morfología de la planta de banano</i>	9
2.1.2. <i>Importancia del cultivo de banano</i>	11
2.1.3. <i>Enfermedades del banano</i>	12
2.2. Marco Conceptual.....	14
2.2.1. <i>Sigatoka negra</i>	14
2.2.2. <i>Mal de Panamá</i>	17
2.2.3. <i>Moko del banano</i>	19
2.2.4. <i>Pudrición blanda</i>	21
2.3. Marco Teórico.....	21
2.3.1. <i>Género Trichoderma</i>	22
2.3.2. <i>Morfología de Trichoderma spp.</i>	23
2.3.3. <i>Trichoderma spp. como agente de biocontrol de enfermedades de plantas</i>	23
2.3.4. <i>Trichoderma spp. como agente promotor del crecimiento de las plantas</i>	24

2.3.5.	<i>Trichoderma spp. como agente natural de descomposición</i>	25
2.3.6.	<i>Metabolismo secundario en Trichoderma spp.</i>	26
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico		27
3.1.	Origen de material biológico	27
3.2.	Métodos y técnicas	27
3.1.1.	Aislamiento e identificación de hongos asociados a síntomas de banano	28
3.1.2.	Obtención y efecto de metabolitos secundarios de <i>Trichoderma spp.</i>	32
3.1.3.	Determinación de la actividad antimicrobiana	32
3.1.4.	Ensayos cualitativos de enzimas líticas	33
CAPÍTULO IV: Resultados y Discusión		36
4.1.	Análisis e Interpretación de Resultados	36
4.1.1.	Microorganismos purificados de plantas sintomáticas de banano	36
4.1.2.	Metabolitos secundarios de <i>Trichoderma spp.</i>	39
4.1.2.1.	Características culturales de <i>Trichoderma spp.</i> en medio sólido	39
4.1.2.2.	Características culturales de <i>Trichoderma spp.</i> en medios líquidos	40
4.1.2.3.	Inhibición del crecimiento micelial por los metabolitos de <i>Trichoderma spp.</i>	41
4.1.3.	Presencia de enzimas líticas	45
4.2.	Discusión	47
CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones		50
5.1.	Conclusiones	50
5.2.	Recomendaciones	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		52
ANEXOS.....		55

Introducción

El cultivo de banano es una de las actividades económicas más importantes en Ecuador, siendo uno de los principales exportadores globales de este fruto. Sin embargo, la producción de banano enfrenta numerosos desafíos, entre los cuales el manejo de plagas y enfermedades es uno de los más significativos (FAO, 2023). Para abordar estos problemas, los agricultores han recurrido extensamente al uso de pesticidas químicos hasta con 40 aplicaciones al año, lo que representa del 40 al 60% del costo total de producción (Arzate-Vega, 2006).

La aplicación de pesticidas en el cultivo de banano tiene como objetivo controlar una variedad de plagas y enfermedades que afectan la calidad y cantidad de la producción. Entre las principales plagas se encuentran el picudo negro o gorgojo del plátano (*Cosmopolites sordidus*) y la mosca de la fruta (*Anastrepha* spp.). Por otro lado, enfermedades causadas por hongos como la Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* (Manzo Gilberto et al., 2004) y la marchitez vascular o pudrición ocasionado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (FOC raza 1 y recientemente FOC raza 4) (Bubici et al., 2019). También, tenemos a las enfermedades causadas por bacterias, las más importantes son marchitez vascular causada por *Ralstonia solanacearum* (Moko del banano), pudrición del pseudotallo por *Erwinia chrysanthemi* y marchitamiento bacteriano por *Xanthomonas campestris* pv (Blomme et al., 2017).

Aunque los pesticidas químicos han demostrado ser eficaces en el control de estas amenazas, su uso generalizado plantea preocupaciones ambientales y de salud. La contaminación de suelos y aguas, la resistencia a los pesticidas, y los efectos adversos sobre la salud de los trabajadores y las comunidades cercanas son temas que preocupan en la actualidad (Hutter et al., 2021).

Existe un mayor control en los productos bananeros exportados, lo cual puede afectar la calidad y seguridad del producto en mercados internacionales. Por tal motivo, la necesidad de establecer estrategias integradas de manejo de plagas que reduzcan la dependencia de químicos se propone como alternativa más sostenible con el medio ambiente y cada vez es más común el uso de control biológico y técnicas de cultivo orgánico (Błaszczuk et al., 2014). La transición hacia prácticas más sostenibles y la investigación continua en el uso de bioinsumos son esenciales para garantizar la viabilidad a largo plazo de este sector agrícola tan importante para la economía del país.

Entre las alternativas más utilizadas, tenemos hongos del género *Trichoderma* que han demostrado un potencial significativo como agentes de biocontrol (Błaszczuk et al., 2014) (Zin & Badaluddin, 2020). *Trichoderma* pueden actuar a través de diferentes mecanismos, incluyendo la producción de enzimas, secreción de compuestos antimicrobianos, y la competencia por recursos y nichos ecológicos (Mukhopadhyay & Kumar, 2020). Estos hongos producen una variedad de metabolitos secundarios que tienen efectos antimicrobianos y antifúngicos contra patógenos de plantas. Han mostrado resultados prometedores en la inhibición de patógenos en cultivos de diferentes plantas, sugiriendo que podrían ofrecer una solución efectiva para el control de enfermedades en el cultivo de banano (Roca & Matilla, 2023).

Este estudio se propone evaluar el efecto de los metabolitos secundarios producidos por cepas de *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* en el control de microorganismos patógenos aislados de cultivos de banano. La investigación busca determinar la eficacia de estos metabolitos en la supresión de patógenos específicos y explorar su potencial como una alternativa viable a los fungicidas químicos convencionales.

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

1.1. Planteamiento del problema

Existen varios factores a considerar que influyen en la proliferación de plagas y enfermedades en el cultivo del banano. En primer lugar, la práctica intensiva de monocultivos puede llevar a la degradación y a la pérdida de biodiversidad del suelo. También, se debe considerar que Ecuador es susceptible a fenómenos climáticos como El Niño y La Niña, que pueden causar sequías prolongadas o lluvias excesivas, afectando negativamente el crecimiento y la producción del banano. Estas alteraciones en el clima pueden cambiar la distribución y la intensidad de enfermedades y plagas, lo que afecta las condiciones óptimas para el cultivo.

Los patógenos que afectan a los cultivos de banano pueden causar enfermedades severas que reducen la calidad y el rendimiento de las cosechas. Las manifestaciones de estas enfermedades incluyen marchitez, manchas foliares y reducción en la producción de frutos.

El control de enfermedades y plagas a menudo depende de la aplicación intensiva de fungicidas y pesticidas, lo que puede generar resistencia en los patógenos y aumentar costos de producción. Es importante considerar que el uso excesivo de productos químicos tiene repercusiones negativas en el medio ambiente y en la salud de los trabajadores agrícolas.

La falta de implementación de prácticas agrícolas adecuadas, como el manejo integrado de plagas y enfermedades, puede reducir la eficacia de los controles y aumentar el riesgo de pérdidas.

1.2. Delimitación del problema

La investigación se centrará en cultivos de banano ubicados en regiones específicas de Ecuador donde se seleccionarán fincas en áreas con incidencia de enfermedades fúngicas y bacterianas.

Las cepas de *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* serán usadas debido a su potencial previamente documentado en la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Con ello, se pretende evaluar los efectos de los metabolitos en términos de inhibición del crecimiento de los patógenos de banano. Con ello se pretende obtener metabolitos clave que muestren potencial para el desarrollo de un bioproducto comercial.

1.3. Formulación del problema

¿Cómo afectan los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* al crecimiento y desarrollo de patógenos que afectan a los cultivos de banano (*Musa* sp.)?

1.4. Preguntas de investigación

Tabla 1

Preguntas de Investigación

Pregunta	Objetivo
¿Cuáles son las cepas de microorganismos patógenos presentes en	Identificar las cepas de microorganismos patógenos aislados

los cultivos de banano que causan síntomas específicos?	que presentan síntomas en el cultivo de banano.
¿Cuáles son las condiciones óptimas de fermentación que maximizan la producción de biomasa y metabolitos secundarios en cepas de <i>Trichoderma</i> spp.?	Establecer las condiciones de fermentación inicial para obtener mayor biomasa y metabolitos secundarios de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.
¿Cuál es el efecto de los extractos metabólicos de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en la inhibición del crecimiento micelial de microorganismos patógenos asociados a enfermedades en el cultivo de banano?	Cuantificar la inhibición del crecimiento micelial de microorganismos asociados a síntomas de enfermedades en banano por los extractos metabólicos de <i>Trichoderma</i> spp.

1.5. Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* en la inhibición del crecimiento de patógenos asociados a enfermedades en banano (*Musa* sp.).

1.5.2 Objetivos específicos

1. Identificar las cepas de microorganismos patógenos aislados que presentan síntomas en el cultivo de banano.

2. Establecer las condiciones de fermentación inicial para obtener mayor biomasa y metabolitos secundarios de las cepas de *Trichoderma* spp.
3. Cuantificar la inhibición del crecimiento micelial de microorganismos asociados a síntomas de enfermedades en banano por los extractos metabólicos de *Trichoderma* spp.

1.6. Justificación

La investigación sobre el efecto de los metabolitos secundarios producidos por cepas de *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* en el control de microorganismos patógenos en cultivos de banano (*Musa* sp.) se fundamenta en varias razones científicas y prácticas que subrayan su relevancia y potencial impacto en la agricultura moderna. Al ser el banano uno de los cultivos más importantes a nivel global, su productividad se ve amenazada por la proliferación de patógenos fúngicos y bacterianos que reducen la calidad y el rendimiento de los frutos. Las enfermedades como la sigatoka negra, causada por *Pseudocercospora fijiensis*, y la marchitez por *Fusarium*, son problemas persistentes que afectan la salud y la rentabilidad de los cultivos (Bubici et al., 2019).

Por otro lado, los metabolitos secundarios producidos por cepas de *Trichoderma* como las tricoederminas, antibióticos, y enzimas que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, han mostrado potencial como agentes de control biológico debido a sus propiedades antifúngicas y antibacterianas, ofreciendo una alternativa natural a los tratamientos químicos (Mesa Vanegas et al., 2020).

El uso de metabolitos secundarios para el control de enfermedades se utiliza actualmente como prácticas de manejo integrado de enfermedades, que buscan combinar métodos biológicos, culturales y químicos para controlar enfermedades de manera

sostenible. Evaluar la eficacia de estos metabolitos permitirá desarrollar estrategias más efectivas para el control de enfermedades en cultivos de banano.

De igual forma, este trabajo de investigación contribuirá al conocimiento científico sobre la producción de metabolitos secundarios de *Trichoderma*, aislados de suelos ecuatorianos. Esto puede abrir nuevas vías para el desarrollo de bioinsumos y mejorar la formulación de productos para el control biológico en cultivos específicos.

Esta investigación es crucial para el desarrollo de métodos de control biológico sostenibles y eficaces para los cultivos de banano en Ecuador. Evaluar el impacto de los metabolitos secundarios, no solo ofrece la posibilidad de mejorar la salud y la productividad de los cultivos de banano, sino que también contribuye a la protección del medio ambiente, la salud y a la economía agrícola mediante la reducción de la dependencia de fungicidas químicos.

1.7. Declaración de las variables (Operacionalización)

Tabla 2

Operacionalización de variables

OBJETIVOS	VARIABLES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	INSTRUMENTOS
Objetivo 1 Identificar las cepas de microorganismos patógenos aislados que presentan síntomas en el cultivo de banano.	Variable Independiente: Síntomas de enfermedad.	Diversidad de hongos patógenos.	Características macroscópicas (color y apariencia del cultivo). Características microscópicas (forma del micelio, y morfología de esporas).	Observación directa.
	Variable Dependiente: Género de los microorganismos aislados.	Diversidad de bacterias patógenas.	Características macroscópicas (color y apariencia del cultivo, forma,	Observación bajo el microscopio.

			elevación y margen de la colonia). Características microscópicas (presencia de conidios y forma del micelio).	
<p>Objetivo 2</p> <p>Establecer las condiciones de fermentación inicial para obtener mayor biomasa y metabolitos secundarios de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.</p>	<p>Variable Independiente:</p> <p>Diferentes formulaciones de medios de cultivo.</p> <p>Especie de <i>Trichoderma</i>.</p> <p>Variable Dependiente:</p> <p>Biomasa de <i>Trichoderma</i> spp.</p> <p>Rendimiento de fracción metabólica extraída.</p>	<p>Expresión de metabolitos secundarios en distintos medios de cultivo.</p>	<p>Cuatro tipos de formulaciones de medios de cultivo para el crecimiento de dos cepas de <i>Trichoderma</i>.</p>	<p>Tasa de esporulación de <i>Trichoderma</i> spp. (ufc/ml) a los 8 y 21 días de incubación.</p> <p>Observación microscópica del micelio.</p>
<p>Objetivo 3</p> <p>Cuantificar la inhibición del crecimiento micelial de microorganismos asociados a síntomas de enfermedades en banano por los extractos metabólicos de <i>Trichoderma</i> spp.</p>	<p>Variable Independiente:</p> <p>Medios de cultivo.</p> <p>Microorganismos patógenos.</p> <p>Especie de <i>Trichoderma</i> spp.</p> <p>Variable Dependiente:</p> <p>Inhibición del crecimiento micelial de los hongos (<i>Pseudocercospora</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp.) y de las bacterias (<i>Ralstonia</i> sp. y <i>Erwinia</i> sp.).</p>	<p>Método de crecimiento micelial con dosificación del extracto en el medio de cultivo.</p>	<p>Diámetros de crecimiento de las colonias de hongos y bacterias.</p>	<p>Porcentaje de inhibición del crecimiento usando extractos crudos.</p>

CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

2.1. Antecedentes Referenciales

2.1.1. Características y morfología de la planta de banano

El nombre genérico *Musa* viene de la palabra árabe *mouz*. Las bananas fueron conocidas en el mundo árabe antiguo y aparecen en el Koran como “árbol del paraíso”. La primera clasificación científica fue realizada por Linnaeus en 1783, le dio el nombre de *Musa sapientium* a todas las frutas que eran dulces y se podían comer frescas; mientras que al grupo de los plátanos que se consumían cocinados los llamo *Musa paradisiaca* (Robinson & Galán, 2010).

La planta de banano pertenece a la familia *Musaceae* que es cultivada en regiones tropicales y subtropicales. Difiere de las características típicas de los cultivos hortícolas. Es monocotiledónea, herbácea y perenne de gran tamaño. Se la considera una hierba porque cuando ya se cultiva la fruta, sus partes aéreas caen al suelo, pero no tiene componentes leñosos. Es perenne porque de la base de la planta nace un nuevo un brote llamado hijo, que reemplaza las partes aéreas de la planta madre.

De la planta de banano se pueden distinguir tres partes importantes de la planta: el cormo con hijuelos y el sistema radical, el pseudotallo con el sistema foliar y el racimo o inflorescencia. El tallo verdadero del banano se encuentra bajo tierra, se lo conoce como cormo, pero el término botánico correcto es rizoma. El punto de crecimiento del rizoma, el meristemo apical, es una cúpula aplanada desde la cual se forman las hojas y, eventualmente, la inflorescencia (Mostafa, 2021).

El sistema radicular se encarga de absorber, transportar el agua, y transferir los nutrientes del suelo hacia la planta. Las plantas de banano tienen un sistema radicular

primario y uno adventicio. Las raíces primarias se originan en la superficie del cilindro central del rizoma, y las secundarias y terciarias, en las raíces primarias. El hijo es un brote lateral que se desarrolla desde el rizoma, y generalmente surge muy cerca de la planta progenitora, también llamada planta madre. Cuando el hijo apenas sale de la superficie del suelo se llama hijuelo. Cuando ya ha crecido y tiene hojas verdaderas se denomina hijo (Soto, 2014).

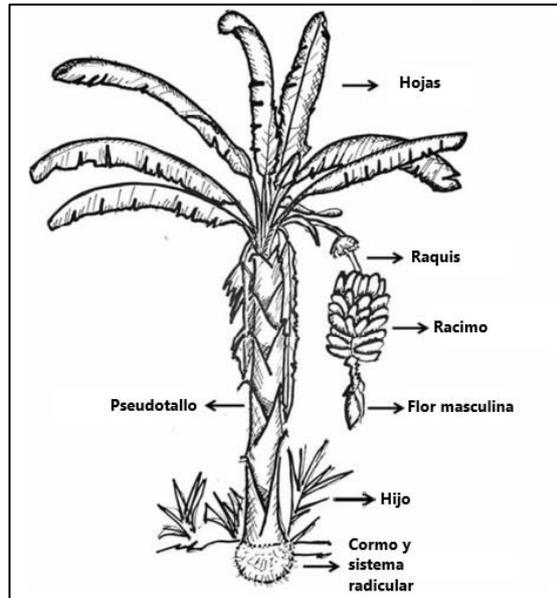
La parte más parecida a un tronco es, en realidad, un falso tallo denominado pseudotallo, y está formado por un conjunto apretado de vainas foliares superpuestas. Aunque el pseudotallo es muy carnoso y está formado principalmente por agua, es bastante fuerte y puede soportar un racimo de 50 kg o más. La hoja es el principal órgano fotosintético de la planta. Cada hoja emerge desde el centro del pseudotallo como un cilindro enrollado (hoja cigarro). A medida que las hojas emergen, el pseudotallo continúa creciendo hacia arriba y alcanza su máxima altura cuando el tallo floral surge en la parte superior de la planta y sirve de soporte a la inflorescencia, que es una estructura compleja, que contiene las flores que se desarrollarán en frutos (Robinson & Galán, 2010). Existen dos tipos de flores, las femeninas (pistiladas) que aparecen primero. A medida que surge, la bráctea (una hoja modificada) expone las flores femeninas que están aglomeradas en los nódulos y desarrollan manos de frutos. El número de manos en el racimo varía dependiendo del genotipo y las condiciones ambientales (Soto, 2014).

A medida que las flores femeninas se desarrollan en frutos, la porción distal de la inflorescencia se alarga y produce grupos de flores masculinas (estaminadas), cada uno bajo una bráctea. El raquis es el tallo de la inflorescencia, que va desde el primer fruto hasta la yema masculina. A lo largo del raquis aparece un conjunto de frutos llamado racimo que se agrupan en manos (Figura 1). La presencia o ausencia de yema masculina

es una de las características utilizadas para diferenciar entre cultivares (Robinson & Galán, 2010).

Figura 1

Partes de la planta de banano



2.1.2. Importancia del cultivo de banano

El banano es considerado una de las frutas tropicales más importantes para el consumo mundial, así como por su contenido de fuentes de carbono, almidón, vitaminas y minerales. Los cultivos de banano requieren suelos ricos en potasio, nitrógeno y una abundante cantidad de agua (Henriques et al., 1997). Los países productores de banana en orden de importancia son Ecuador, Filipinas, Costa Rica, Brasil, Colombia y Guatemala y los mayores importadores son la Unión Europea, Estados Unidos, China, Rusia y Japón (FAO, 2023).

El banano se produce alrededor del mundo y, en Ecuador se cultiva este producto como un monocultivo de valor comercial. El principal propósito del cultivo es generar

ganancias a través de la exportación, que según el Banco Central del Ecuador genera aproximadamente 3 billones al año (Ortiz et al., 2020).

Según el INEC (2023), se produjo 7,2 millones de toneladas de fruta que se cultivan en 175.181 hectáreas en Ecuador. Las principales provincias donde se cultiva el banano son Los Ríos (38%), Guayas (31%), El Oro (20%) y el resto en otras provincias (11%).

Desde el año 2022, el comercio mundial de banano se ha visto afectado por varios factores, que han provocado al aumento de los costos de producción y la escasez de oferta frente a una demanda relativamente estable en los mercados clave de importación. Factores como la subida en los precios de los fertilizantes, las condiciones climáticas adversas, el aumento del porcentaje de rechazo de productos que no cumplen las normas de calidad esperadas y una mayor rigurosidad de los niveles máximos de residuos, sobre todo en los Estados Unidos y la Unión Europea, han aumentado la presión sobre productores y exportadores, ya que los productos que no cumplen estos nuevos requisitos no pueden exportarse. La escasez de contenedores por los bloqueos en algunos países asiáticos, junto con los altos costos de transporte global, han representado barreras adicionales para el crecimiento de las exportaciones (FAO, 2023).

2.1.3. Enfermedades del banano

En la actualidad existen graves preocupaciones por la propagación de enfermedades de las plantas de banano ya que causan muchas pérdidas económicas. La más seria de estas enfermedades es la mancha negra de las hojas o Sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, que es una enfermedad fúngica estrechamente relacionada pero más virulenta que la Sigatoka amarilla común (*Mycosphaerella musicola*) (Churchill, 2011). La mancha negra de las hojas ha causado devastación a los

plátanos comerciales cultivados en localidades tropicales y también se ha extendido a los plátanos cultivados en situaciones de pequeños productores (Manzo Gilberto et al., 2004).

Otra enfermedad importante del plátano es la enfermedad del marchitamiento de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, que destruyó más de 40,000 hectáreas de plátanos de exportación 'Gros Michel' en América, hasta que este cultivar fue reemplazado por los plátanos del subgrupo AAA Cavendish resistentes a finales de los años 50. Actualmente, otra raza de la enfermedad de Panamá, conocida como "raza subtropical 4", está destruyendo plantaciones de plátano Cavendish en países subtropicales como Sudáfrica, Taiwán y partes de Australia (Robinson & Galán, 2010). Nuevas cepas de este hongo, conocidas coloquialmente como "raza tropical 4" (TR4), comenzaron a atacar a los Cavendish y otros cultivares plantados en los años 90 en Malasia e Indonesia, y existe un grave riesgo de que esto también afecte a las plantaciones de plátano Cavendish en América, África o el Caribe (Bubici et al., 2019).

Además de la mancha negra de las hojas y la enfermedad de Panamá, otras enfermedades del plátano causadas por bacterias como la enfermedad del Moko (García et al., 2019), la enfermedad del tope abultado del plátano y la enfermedad de la mancha del plátano siguen siendo amenazas serias para la producción mundial y la situación no ha cambiado mucho en los últimos 20 años.

Mientras tanto, nuevos problemas de enfermedades, como el marchitamiento por *Xanthomonas* o la pudrición blanda causada por *Erwinia* (Aguilar-Ancota et al., 2021), en donde los tratamientos químicos no son efectivos hace que la mejora de la resistencia siga siendo una prioridad crítica de investigación para superar la amenaza de todas estas enfermedades, un enfoque más integrado es ahora una prioridad.

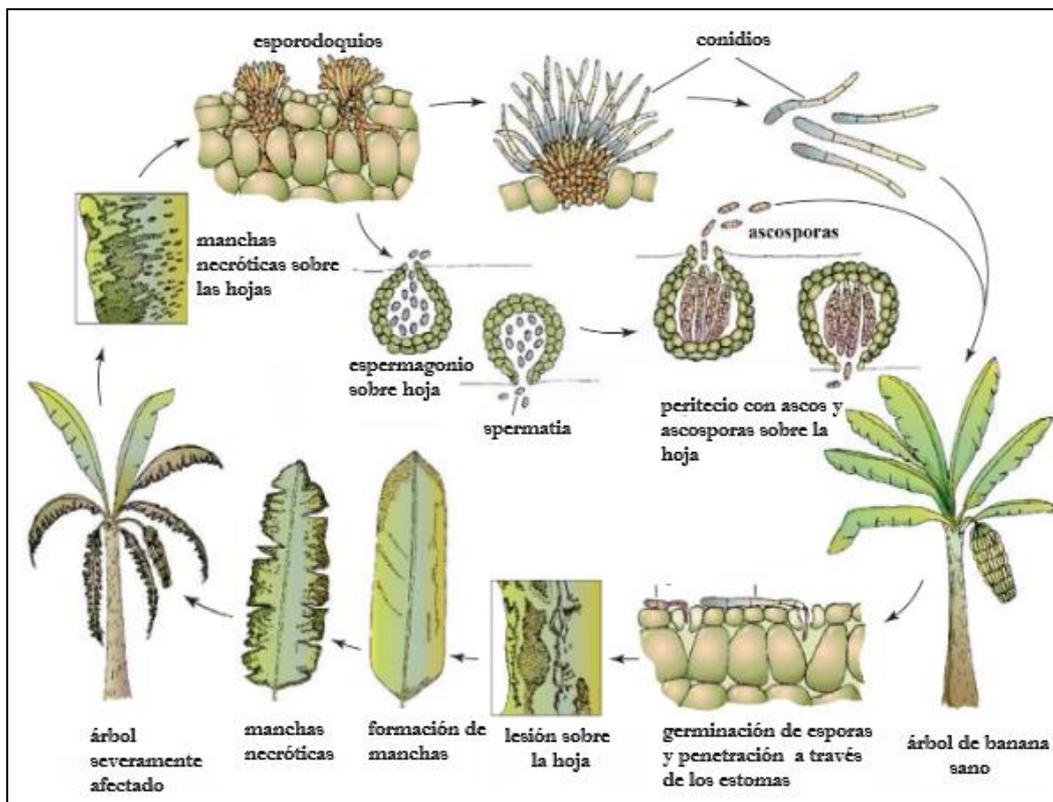
2.2. Marco Conceptual

2.2.1. *Sigatoka negra*

Uno de los estreses bióticos más destructivos del banano es la Sigatoka negra, una enfermedad fúngica foliar causada por *Pseudocercospora fijiensis*. El hongo es heterotálico, es decir, produce conidios asexuales y ascosporas sexuales durante todo el año (Figura 2). La enfermedad es policíclica y resulta en múltiples infecciones en un ciclo del banano (Manzo Gilberto et al., 2004).

Figura 2

Ciclo de desarrollo de *Sigatoka*



Nota. Adaptado de "Agrios' Plant Pathology", por Oliver, R, 2024. Academic Press.

Los patógenos de *Pseudocercospora* en bananos son hemibiótrofos. Una vez que las esporas de estos patógenos se diseminan sobre la superficie de las hojas del banano y las condiciones ambientales son propicias para el crecimiento del patógeno, germinan

y penetran los tejidos foliares a través de los estomas para colonizar los espacios intercelulares dentro de las capas de mesófilo y células paliadas (Alakonya et al., 2018).

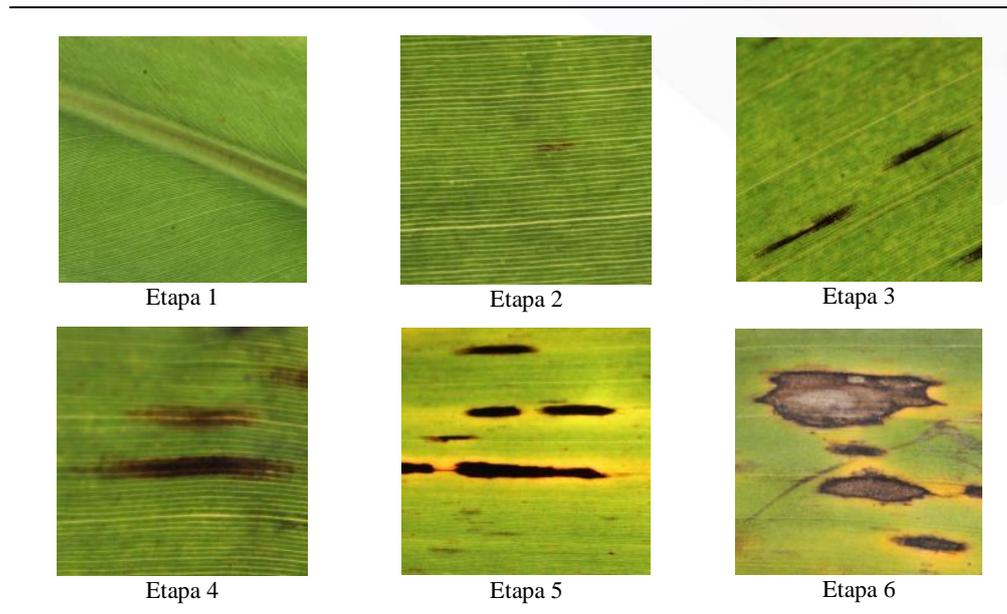
La expresión de síntomas ocurre entre 7 y 14 días después de la infección y se manifiesta mediante estrías en las hojas que se tornan necróticas, reduciendo significativamente la capacidad de fotosintética de la hoja (Oliver, 2024).

Según la escala de Fouré, los síntomas de la Sigatoka negra se pueden reconocer a través de seis etapas (Figura 2):

- Etapa 1. Pequeñas lesiones o puntos de color amarillento, menores a 1 mm de longitud, apenas visibles en el envés de las hojas.
- Etapa 2. Rayas o estrías marrones de 3–4 mm de longitud.
- Etapa 3. Las estrías se alargan y amplían dando la impresión de haber sido pintadas con pincel, sin bordes definidos y de color café, que pueden alcanzar hasta 2 cm de longitud.
- Etapa 4. Manchas de forma ovalada o elíptica de color café en el envés y negro en el haz.
- Etapa 5. Es la primera etapa necrótica, la mancha es negra rodeada de un halo amarillo. El centro seco y semihundido.
- Etapa 6. Es cuando el centro de la mancha se seca, se vuelve gris claro y está rodeado por un anillo negro bien definido, que a su vez está rodeado por un halo amarillo brillante. Dado que el anillo persiste, estas manchas siguen siendo visibles después de que la hoja se haya secado (Fouré, 1987).

Figura 3

Síntomas de las seis etapas de Sigatoka negra



Nota. Adaptado de “Varietal Reactions of Bananas and Plantains to Black Leaf Streak Disease”, por (Fouré, 1987).

La presencia de numerosas y grandes manchas provoca la muerte de tejido foliar llegando a afectar incluso la hoja completa, reduciendo significativamente el número de estas, afectando indirectamente sobre el racimo, pudiendo ocasionar una maduración prematura, tornándola no apta para su comercialización. Esto puede llevar a una pérdida de rendimiento del 35 al 100%, dependiendo del cultivar, las condiciones ambientales y el nivel de infección (Churchill, 2011).

El control de esta enfermedad se basa principalmente en el uso de fungicidas, cuya aplicación genera un costo de 30 a 40% de la producción; sin embargo, esta medida de control provoca contaminación al ambiente, problemas de salud humana y genera resistencia del hongo (Manzo Gilberto et al., 2004).

2.2.2. Mal de Panamá

La marchitez vascular causada por *Fusarium* en el cultivo de banano es causada por diferentes cepas o genotipos del patógeno del suelo *F. oxysporum* f. sp. cubense

(FOC). Según la clasificación tradicional propuesta por Stover (1962), hay tres razas de FOC (razas 1, 2 y 4) que atacan cultivares de banano comestibles, y una (raza 3) que solo ataca a *Heliconia* spp. El primer informe de FOC ocurrió en Australia en 1874, pero se volvió epidémico en América Central en 1890 (Panamá). Actualmente, la enfermedad está muy extendida en las regiones productoras de banano de Asia, África, Australia, el Pacífico Sur y América Latina (Robinson & Galán, 2010).

Aunque los síntomas se observan primero en las hojas, el sitio inicial de infección es el sistema radicular, principalmente en las raíces secundarias y terciarias, donde el hongo penetra a través de los tejidos y se propaga a través de los vasos del xilema hacia el rizoma y el pseudotallo. Se producen múltiples ciclos de infección en una plantación de bananos infestada con Foc (Ploetz et al., 2015). Las raíces más grandes rara vez se infectan, y aunque la planta puede ocasionalmente ser infectada a través del rizoma o el pseudotallo, tales infecciones suelen permanecer localizadas.

El ciclo de vida de Foc se observa en la Figura 4, las clamidosporas en el suelo se estimulan para germinar por los exudados nutritivos de las raíces de banano y de plantas no hospedadoras. Aquellos que infectan las puntas de las raíces secundarias y terciarias del banano penetran la cubierta radical y la zona de elongación, estableciendo una relación parasitaria intercelular en el córtex radicular, antes de ingresar a los elementos vasculares del xilema (Bubici et al., 2019).

Cerca del ápice en la raíz de banano se encuentra el xilema, y a medida que este madura, los vasos se vacuolan y el protoplasma y el núcleo desaparecen de dichos elementos. El xilema actúa como una barrera contra el avance del patógeno y la probabilidad de que la infección alcance el rizoma es baja, estimándose en aproximadamente una raíz de cada 20 (Buddenhagen, 2009). Sin embargo, el patógeno

puede moverse pasivamente en el lumen vacío de los vasos maduros. El movimiento inicial a través de las raíces puede ser lento, requiriendo alrededor de cuatro semanas para avanzar 75 cm, pero en los vasos de xilema maduros, el patógeno puede crecer 30 cm en dos a tres días, con cada nueva generación de esporas. Una vez que alcanza el rizoma, el patógeno puede distribuirse dentro del pseudotallo en menos de dos semanas (Pegg et al., 2019).

La invasión sistémica de los vasos del xilema en el pseudotallo no necesariamente necesita ocurrir para que los síntomas de marchitez se hagan evidentes. Se ha propuesto la participación de metabolitos tóxicos en la patogénesis. Se cree que el ácido fusárico, que es producido por *Foc* y otras especies de *Fusarium*, contribuye a la expresión de síntomas. La planta de banano puede tardar en mostrar síntomas externos porque tiene una capacidad vascular de dos a tres veces superior a la que necesita para su crecimiento y reproducción (Bubici et al., 2019).

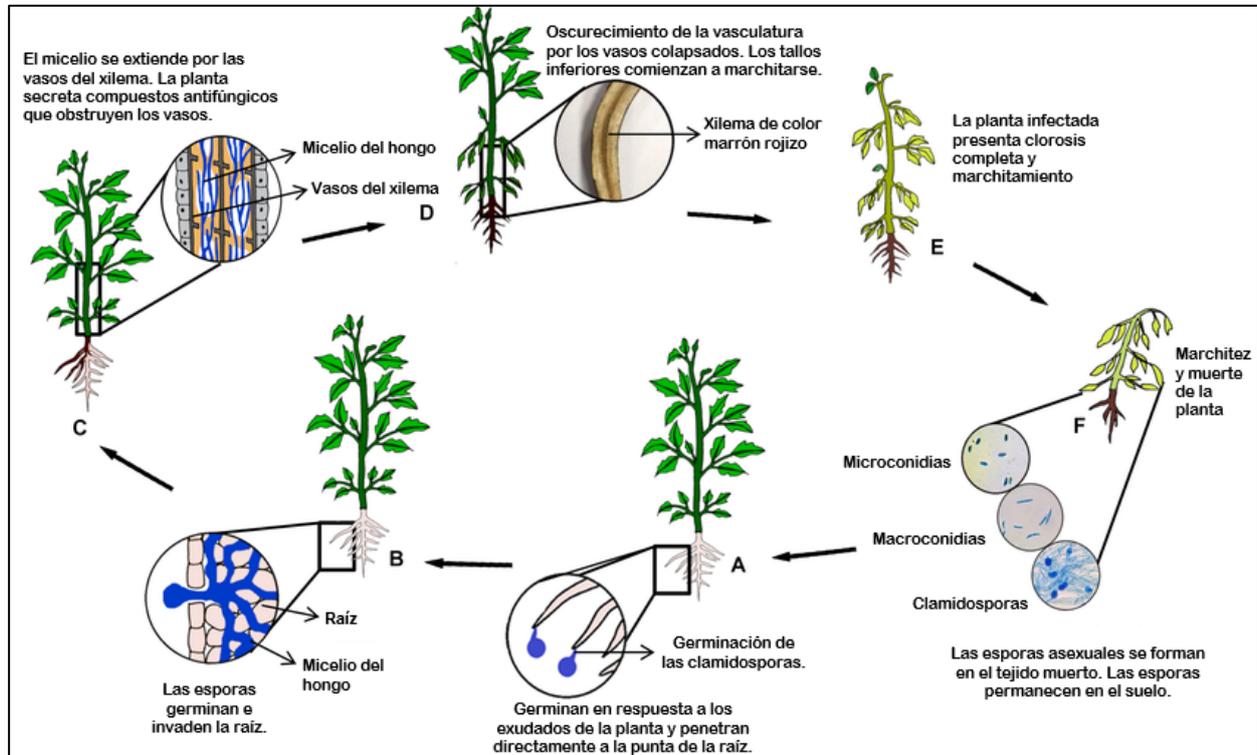
Cuando se corta el pseudotallo o rizoma de una planta infectada, los tejidos vasculares muestran puntos y estrías marrón rojizo. Externamente, las hojas más viejas se tornan amarillas prematuramente. La clorosis inicia a lo largo de los márgenes de las hojas y avanza hacia la nervadura central. Las hojas se empiezan a doblar y cuelgan alrededor del pseudotallo como una falda. Finalmente, la planta muere después de florecer. Los síntomas son similares a los de la falta de agua, ya que los vasos conductores están bloqueados por los mecanismos de defensa de la planta (Pegg et al., 2019).

En el caso de una infección severa en el suelo, las plantas jóvenes pueden marchitarse y morir cuando solo tienen unos pocos meses. Factores como el agua y el material de plantación infectado son los dos principales métodos de dispersión del patógeno a largas distancias. La propagación a corta distancia se ve facilitada por el suelo

infectado adherido a herramientas y zapatos, así como por el contacto raíz a raíz. Las áreas infectadas deben ser cercadas y no se debe permitir el acceso (Jangir et al., 2021).

Figura 4

Ciclo de enfermedad de *Fusarium oxysporum*



Nota. Adaptado de “Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*”, por Jangir, et al, 2021.

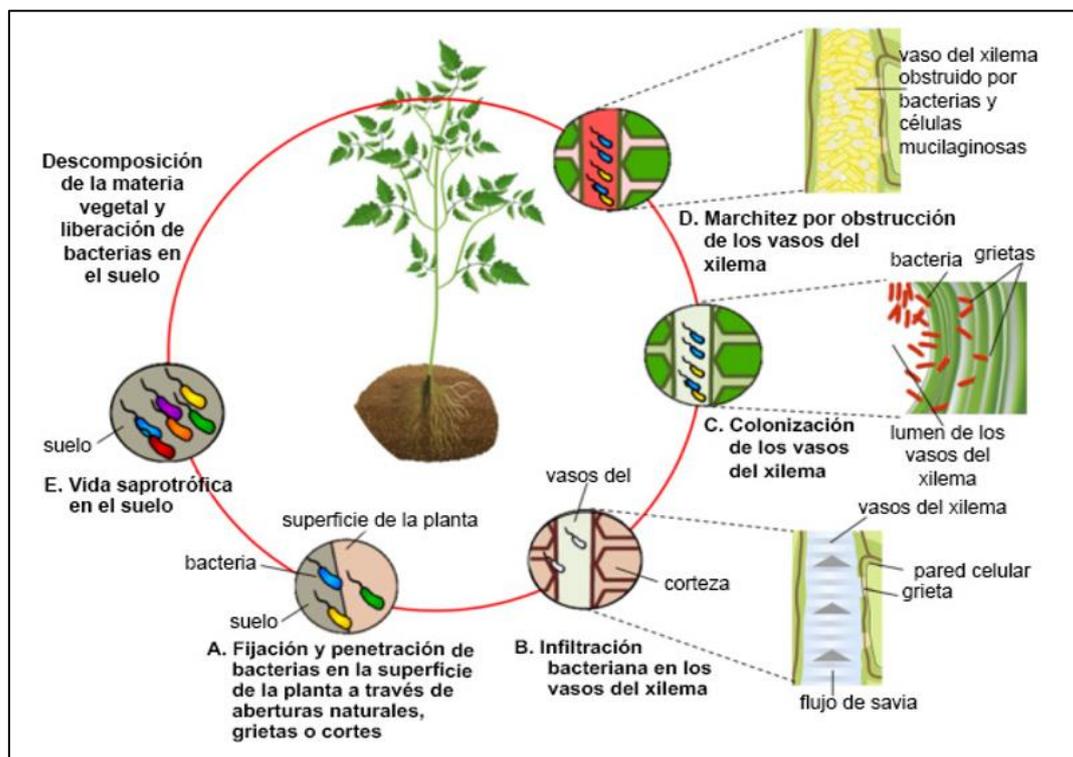
2.2.3. Moko del banano

El moko bacteriano es uno de los problemas fitosanitarios más importantes en la industria bananera, siendo la principal enfermedad bacteriana en este cultivo. Es causada por la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* que es sumamente agresiva, con una distribución global y un amplio rango de hospederos que incluye plantas de al menos 50 familias botánicas diferentes. En la actualidad la enfermedad se encuentra presente en varios países productores de plátano en América, Asia, África y Oceanía (Alvarez et al., 2008).

Como se observa en la Figura 5, el patógeno sobrevive o permanece latente en residuos de cosecha infectados y en la rizósfera de malezas hospederas, siendo este el inóculo primario e infecta a plantas sanas por las raíces y heridas, colonizando los vasos del xilema. Los síntomas que presenta esta enfermedad son hojas amarillas y flácidas que finalmente colapsan y quedan adheridas a la planta, los frutos son chiclosos y de aspecto oscuro. Se observa una necrosis vascular interna y la presencia de puntos oscuros debido a una infección sistémica (García et al., 2019).

Figura 5

Ciclo de infección de bacterias



Nota. Adaptado de eorganic, 2022. (<https://eorganic.org/node/35266>)

Las estrategias de control consisten en la utilización de semillas o plántulas sanas, la detección temprana de las plantas infectadas, la eliminación de todas las plantas ubicadas en un radio de 5-10 m a partir del foco inicial y en su cuarentena por seis meses como mínimo (Obrador-Sánchez et al., 2017).

2.2.4. Pudrición blanda

La pudrición bacteriana blanda en Musáceas son causadas por especies del género *Erwinia* principalmente *E. chrysanthemi* y *E. carotovora*. Estas bacterias afectan al pseudotallo, tejidos en descomposición y frutos de banano (Aguilar-Ancota et al., 2021).

La pudrición acuosa se extiende desde la parte superior e inferior hasta alcanzar la base de la vaina, y desde la parte externa hacia la interna del pseudotallo llegando a infectar el interior de las vainas y rizoma, generando el colapso de la planta. En un estado avanzado los tejidos se degradan, producto de la acción enzimática de los agentes causales y presentan mal olor (Robinson & Galán, 2010).

La incidencia de la enfermedad es favorecida por diversos factores como alta densidad de plantas, riego por aspersión, deshierbas inoportunas, mala nutrición, falta de desinfección de las herramientas de trabajo. Las alternativas de control son sanitarias y culturales como remover restos de la planta en descomposición, desinfectar las herramientas y minimizar cortes en los órganos de las plantas. También, las opciones de productos biológicos provenientes de *Bacillus* y *Trichoderma* tienen un buen efecto antagonista y los productos químicos como desinfectantes a base de yodo y compuestos cúpricos constituyen herramientas valiosas para un programa integrado de manejo del cultivo (Vargas et al., 2022).

2.3. Marco Teórico

2.3.1. Género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* de acuerdo a sus distintas capacidades son considerados como hongos multifuncionales que se encuentran en una gran variedad de ecosistemas como en suelos forestales o agrícolas y es uno de los habitantes comunes de la rizósfera

de las plantas. El éxito de las especies de *Trichoderma* en el ecosistema del suelo y su papel como descomponedor natural se debe a su capacidad para crecer rápidamente, facilidad de absorción de nutrientes y su habilidad para modificar la rizósfera. También son capaces de tolerar ambientes desfavorables y tienen una poderosa capacidad destructiva contra microorganismos patógenos de plantas (Błaszczyk et al., 2014).

Desafortunadamente, además de la grandeza del género en el control de enfermedades de plantas, las especies de *Trichoderma* también causan un gran efecto dañino en la producción de champiñones. Algunos de estos hongos pueden actuar como patógenos humanos ya que son productores de micotoxinas. Un ejemplo de ello es la trichodermina, secretada por *T. brevicompactum* comúnmente contamina fuentes alimentarias y el consumo de estas micotoxinas conduce a vómitos y gastroenteritis. Además, se ha reportado que *T. longibrachiatum* es un patógeno humano emergente en pacientes inmunocomprometidos (Zin & Badaluddin, 2020).

En consecuencia, mientras los estudios sobre estos hongos como biocontroladores continúan, también se necesita enfocar más investigación para evitar los riesgos para humanos, plantas y otros organismos. Al mismo tiempo, el género *Trichoderma* spp. tiene algunas ventajas sobre los microorganismos del suelo ya que pueden mejorar el crecimiento vegetal mediante la liberación de compuestos similares a hormonas que estimulan el desarrollo radicular y el crecimiento vegetal. El rápido crecimiento vegetal induce poblaciones microbianas a través de la secreción de cantidades significativas de exudados radiculares, lo que a su vez aumenta la disponibilidad de nutrientes para el consumo microbiano (Awad et al., 2018).

2.3.2. Morfología de *Trichoderma* spp.

Las cepas de *Trichoderma* pueden ser identificadas por características morfológicas comunes como el pigmento verde de las conidias, crecimiento rápido y su ramificación bajo el microscopio. Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* tienen alrededor de 10,000 especies, la mayoría de rápido crecimiento. Al principio, las cepas de *Trichoderma* aparecen blancas y algodonosas, luego desarrollan colores verde-amarillentos hasta verde oscuro, especialmente en el centro o en zonas concéntricas similares a anillos en la superficie del agar (Mesa Vanegas et al., 2020).

Microscópicamente, las fiálides de *Trichoderma* spp. son hifas estériles, septadas que forman conidióforos ramificados como un árbol pequeño. Son compactados con un sistema de ramas en forma piramidal. Las esporas asexuales o conidios son globosos o subglobosos dependiendo de la especie. Las clamidosporas se forman al final del crecimiento en los medios de cultivo, son intercaladas o raramente terminales, redondas y de doble pared, funcionando como esporas de reposo durante condiciones desfavorables (Mukhopadhyay & Kumar, 2020).

2.3.3. *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol de enfermedades de plantas

El biocontrol puede definirse como el uso de organismos vivos para reducir la población de plagas y enfermedades de una forma amigable con la naturaleza. Las especies de *Trichoderma* son los agentes de control biológico más utilizados contra un amplio espectro de patógenos radiculares, de tallo y postcosecha.

Las raíces de las plantas se convierten en el hábitat principal para el hongo. *Trichoderma* se aplica eficazmente durante la siembra y en etapas posteriores de crecimiento de las plantas. Los mecanismos para el control biológico por parte de *Trichoderma* spp. sobre los patógenos son: (i) reconocimiento e invasión hacia especies fúngicas patógenas mediante la disrupción de la pared celular y la absorción de nutrientes

liberados, conocido como micoparasitismo, (ii) inducen la resistencia de la planta hacia enfermedades mediante la alteración de la arquitectura radicular durante la interacción con los patógenos, (iii) compiten con otros microorganismos por nutrientes y espacio y (iv) producen compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (Mukhopadhyay & Kumar, 2020).

La mayoría de sus efectos sobre los cultivos son idénticos, sin embargo, hay relaciones específicas por especie e incluso por cepa. Los productos que se comercializan comúnmente se formulan en polvo mojable o gránulos y contienen una o más especies de *Trichoderma*, como *T. viride*, *T. virens* y *T. harzianum*. El noventa por ciento de las diversas cepas de *Trichoderma* se aplican a los cultivos con el objetivo de controlar enfermedades debido a las características antagonistas que expresan contra los fitopatógenos. El impacto de su uso como agente de biocontrol en el campo se evalúa en relación con el costo del insumo y la productividad del cultivo. Como resultado, se ha observado que son económicos en comparación con los insumos químicos y ayudan a reducir las pérdidas en los cultivos, aumentando la productividad (Błaszczuk et al., 2014).

2.3.4. *Trichoderma* spp. como agente promotor del crecimiento de las plantas

Existen una gran cantidad de factores que influyen en el crecimiento de las plantas, por ejemplo, la temperatura, la intensidad de la luz, la disponibilidad de nutrientes y la comunidad microbiana. La rizósfera es la zona que rodea a la raíz de la planta y en donde se concentran los nutrientes. Como consecuencia, las comunidades microbianas sostenidas por la rizósfera pueden aportar beneficios, efectos neutros o daños al crecimiento de las plantas. La planta ejerce múltiples conexiones con los habitantes rizosféricos, lo cual es necesario para el desarrollo vegetal y la asimilación de nutrientes.

Los hongos promotores del crecimiento de las plantas son microorganismos que pueden estimular el crecimiento vegetal. Los principales impactos se manifiestan comúnmente en el crecimiento de los cultivos, la calidad del producto final y la productividad. Investigaciones actuales han revelado que las especies de *Trichoderma* pueden ser excelentes promotores de crecimiento ya que mejoran la salud de las plantas, creando un ambiente favorable y produciendo una gran cantidad de metabolitos secundarios (Jogaiah & Abdelrahman, 2019).

2.3.5. *Trichoderma spp. como agente natural de descomposición*

La descomposición se define como el proceso biológico para degradar y descomponer materiales orgánicos en partículas más pequeñas que pueden ser utilizadas por otros organismos. Los descomponedores, como los hongos, desempeñan un papel vital durante este proceso. El ciclo de nutrientes puede ser logrado gracias al papel que desempeñan los descomponedores al devolver los nutrientes de la materia orgánica muerta de nuevo al suelo. Estudios han demostrado que *Trichoderma* incrementa la velocidad de descomposición de materia orgánica en el suelo ya que secreta enzimas como xilanasas, glucanasas y celulasas que degradan las paredes celulares de las plantas (Patil & Chakranarayan, 2021) .

2.3.6. *Metabolismo secundario en Trichoderma spp.*

La producción de energía y el crecimiento celular son procesos similares en todos los organismos, con moléculas implicadas en las reacciones de crecimiento y reproducción siendo las mismas: aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos y ácidos

nucleicos. Estas biomoléculas, clasificadas como metabolitos primarios, funcionan como factores de crecimiento en plantas o como enzimas líticas, sideróforos, antibióticos, y permeasas de carbono y nitrógeno, con sus concentraciones celulares controladas.

En cambio, los metabolitos secundarios se agrupan en policétidos, terpenos, terpenoides, pirógenos, fenoles y alcaloides, lo que indica el origen y la biosíntesis de estos productos. Incluso las especies e incluso los aislamientos de una sola familia pueden producir metabolitos completamente diferentes. Dado que viven en el suelo y en las raíces de las plantas, los hongos se han estudiado y aislado por su capacidad de producir compuestos antiicrobianos. Esta cuestión es importante dada la activación de mecanismos bioquímicos en la producción y la diversidad de productos que se obtienen a partir de especies del género *Trichoderma*.(Mesa Vanegas et al., 2020), (Khan et al., 2020).

CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

3.1. Origen de material biológico

En esta investigación se colectaron muestras de plantas de banano sintomáticas de tizón foliar y marchitez del pseudotallo con el fin de obtener aislados de bacterias y hongos con una alta probabilidad de ser patogénicos en *Musa* spp. Vale destacar que no todos los aislados de la especie de un agente etiológico son necesariamente patogénicos. Los microorganismos así aislados fueron considerados “patogénicos” a los efectos de esta investigación, esto fue suficiente para los objetivos propuestos. Los aislados patogénicos fueron tratados in vitro con metabolitos de cepas de *Trichoderma* spp. y se evaluaron los efectos en el crecimiento de los patógenos.

Se tomaron muestras de hojas y pseudotallos en dos localidades de la región Costa, en el cantón Quevedo, provincia de Los Ríos (longitud oeste 79°27'48.67" y latitud sur S1°1'43.07"). y el cantón Santa Rosa, provincia de El Oro (longitud oeste 79°57'34.27" y latitud sur 3°26'55.75"). El procesamiento de tejidos, aislamiento, purificación y la posterior identificación de los microorganismos fue realizado en el laboratorio microbiológico de Bioseborgamics Cia. Ltda. ubicado en el cantón Ambato, provincia de Tungurahua, a una altitud media de 2752 m.s.n.m., con temperatura media de 16°C entre los meses de junio y julio de 2024. El mismo laboratorio proveyó las cepas de *Trichoderma* spp. identificadas hasta especie, conservadas a -80°C en su colección de cultivos microbianos.

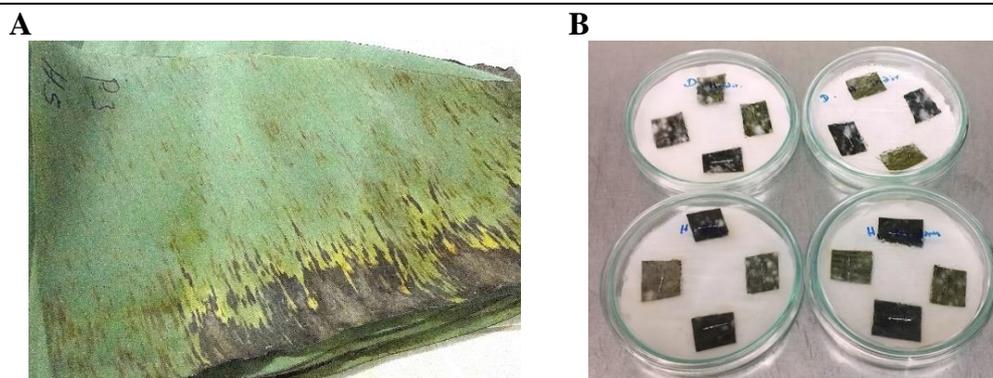
3.2. Métodos y técnicas

3.1.1. Aislamiento e identificación de hongos asociados a síntomas de banano

Sigatoka (Pseudocercospora sp.). Se recolectaron muestras de hojas de banano que mostraron síntomas de enfermedad en la etapa 4 y 5 (Figura 3) según referencia de las seis etapas de enfermedad redefinidas por Fouré (1987). Las muestras se colocaron en bolsas de papel y fueron trasladadas al laboratorio. Para el aislamiento se usó la metodología de descarga de ascosporas descrita por Stover (1963). Las hojas de banano se lavaron tres veces con agua estéril y se cortaron en piezas pequeñas (1x1cm) usando un bisturí estéril (Figura 6A). Se colocaron cuatro pedazos por caja Petri con papel filtro humedecido estéril en el fondo de la caja con el propósito de crear una cámara húmeda (Figura 6B). A las 48 horas se observó bajo el estereoscopio para comprobar la presencia de estructuras reproductivas del hongo fitopatógeno. Los cortes, se colocaron en las tapas de las cajas Petri que contenían agar papa dextrosa (PDA) suplementado con rifampicina (5mg/ml), de modo que el envés de las hojas quedaran hacia el agar, y de esta manera promover la descarga de esporas sobre el medio de cultivo. Se dejó en incubación durante 10 días a 28°C. Posteriormente, se purificaron los hongos en PDA.

Figura 6

Síntomas y aislamiento de Pseudocercospora sp.

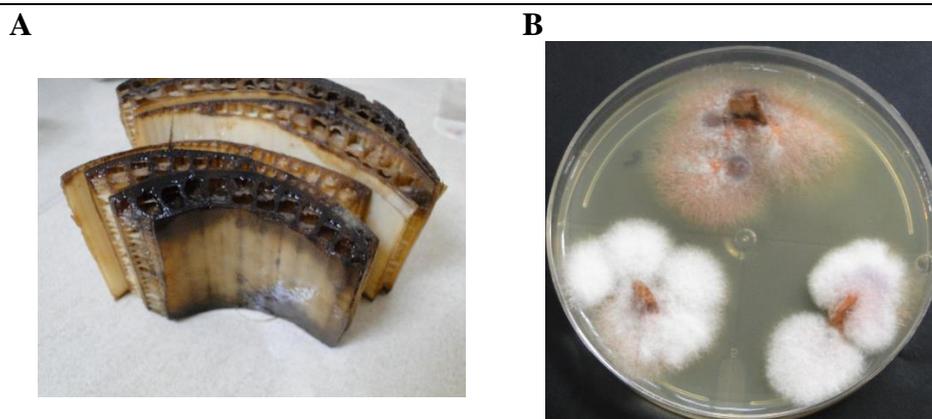


Nota. (A) Hojas de banano con Sigatoka. (B) Cámara húmeda con los cortes de las hojas de banano.

Marchitez de pseudotallo (*Fusarium* sp). Se tomó tejido vascular que mostraba lesiones sintomáticas de color marrón en el pseudotallo (Figura 7A) y se cortó en trozos pequeños. Las piezas fueron esterilizadas superficialmente con agua estéril, luego con etanol al 70% durante 30 segundos y finalmente se lavaron tres veces consecutivas con agua estéril. Los cortes fueron insertados (Figura 7B) en medio PDA suplementado con rifampicina (5mg/ml). Después de la incubación durante 8 días a 28°C de temperatura, las colonias de color blanco con tinte púrpura algodonosas fueron aisladas en cultivo puro.

Figura 7

*Síntomas y aislamiento de *Fusarium* sp.*



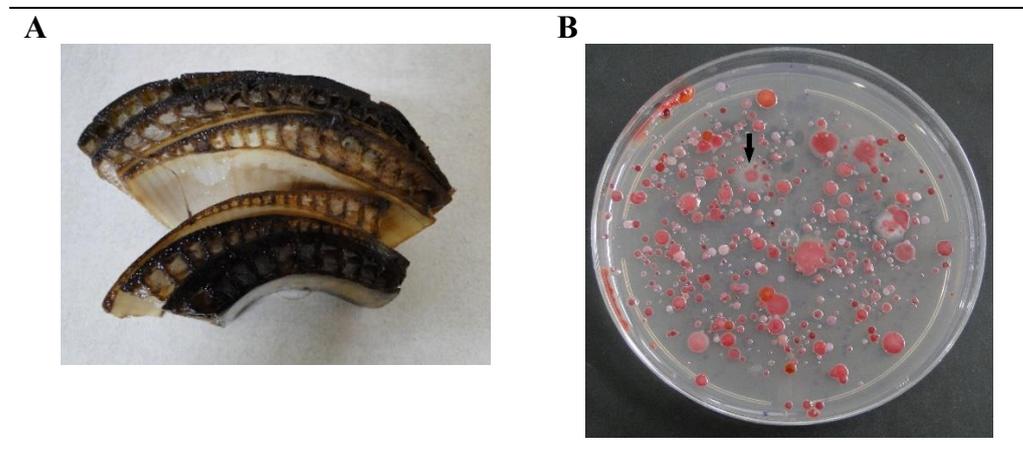
Nota. (A) Pseudotallo de banano con signos de infección. (B) Análisis fitopatológico.

La caracterización cultural de los cultivos fúngicos se realizó en medio PDA (28°C/oscuridad). Se determinaron la morfología de las hifas y de las conidias mediante tinción con azul de lactofenol bajo el microscopio óptico (40x). La identificación y observaciones siguieron las referencias en (Domsch et al., 1993) y(Dapoux, 1983). Además, se evaluó el color de la colonia de acuerdo a la tabla estándar de color (British Standard Specification of Colours for Identification Coding and Special Purposes). Por esta metodología se llegó hasta la identificación de géneros.

Moko del banano (*Ralstonia sp.*). Se procedió a aislar la bacteria a partir de pequeñas porciones de tejido vascular procedente de pseudotallo (Figura 8A). Este tejido fue macerado en agua estéril y a la suspensión resultante se le realizó diluciones seriadas hasta 10⁻⁷. Las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ fueron cultivadas en el medio selectivo Sudáfrica modificado (SMSA) con adición de cloruro de tetrazolio (TTZ) utilizado por Kelman (1954) para la diferenciación de cepas virulentas, de las no virulentas. Las cajas de Petri fueron incubadas a 28 °C por un período de 72 a 96 horas. Las colonias con apariencia blanca con el centro rosado, mucosas, borde irregular y halo claro (Figura 8B) fueron transferidas al medio SMSA y posteriormente a Agar Nutriente (AN, Anexo 1).

Figura 8

*Síntomas y aislamiento de *Ralstonia sp.**

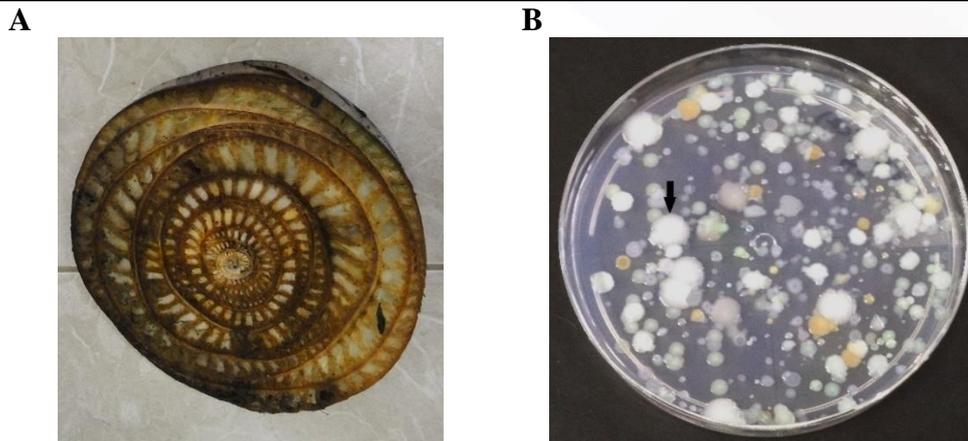


Nota. (A) Pseudotallo de banano con signos de infección. (B) Diferenciación de colonias.

Pudrición blanda (*Erwinia sp.*). Se tomó una porción de tejido con síntomas de pudrición blanda procedente del pseudotallo (Figura 9A). El tejido fue macerado en agua estéril y a la suspensión resultante se le realizó diluciones seriadas hasta 10⁻⁷. Las diluciones 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ fueron inoculadas en medio SMSA (Anexo 1). Las cajas de Petri fueron incubadas a 28 °C por un período de 72 a 96 horas. Las colonias con apariencia blanca, circulares y mucosas, fueron seleccionadas y transferidas a medio AN (Anexo 1), para garantizar su pureza.

Figura 9

Síntomas y aislamiento de *Erwinia* sp.

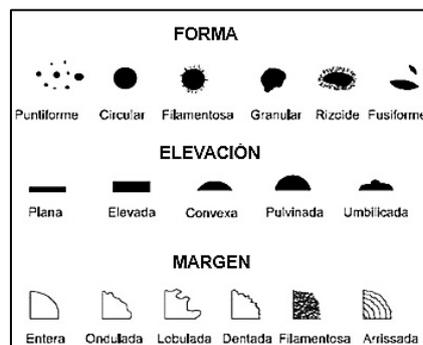


Nota. (A) Pseudotallo de banano con signos de infección. (B) Diferenciación de colonias.

Para las características macroscópicas de las bacterias se evaluó la morfología de las colonias en medio AN. El color de la colonia se anotó basándose en una tabla estándar de color (British Standard Specification of Colours for Identification Coding and Special Purposes) y la forma, elevación y tipo de margen de acuerdo a la Figura 10. Para las características microscópicas se realizó tinción de Gram y se observó la forma de la célula.

Figura 10

Diagrama que ilustra la forma, elevación y margen de las colonias bacterianas



Nota. Adaptado de "Colony Morphology Protocol" (p. 3), por (Breakwell et al., 2016), *American Society for Microbiology*.

3.1.2. Obtención y efecto de metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp.

Obtención de caldos. Cultivos puros de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* se reactivaron en PDA a 28 °C durante de 10 días. De cada especie se inoculó un stock de conidias a una concentración de 1×10^5 ufc/ml en Erlenmeyers con 1500 ml de cuatro medios líquidos estériles, Potato Dextrose Broth, Sabouraud Broth, Cornmeal Broth y Richard's Broth (Anexo 1). Se emplearon tres repeticiones por cada medio y por cepa. Los Erlenmeyers se incubaron en un agitador orbital a 100 rpm y entrada de aire estéril a 28°C durante 21 días. A cada frasco se le determinó la tasa de esporulación se evaluó después ocho días de incubación y a los 21 días de cultivo. Para ello, se colocaron 5 ul de cada caldo en el hemocitómetro y se determinó la concentración de esporas.

Obtención de extractos metabólicos. Después de la incubación, los caldos fueron filtrados dos veces para eliminar el micelio por un filtro Whatman No. 1. Se tomaron alícuotas de 250 ml del extracto que se colocaron en un baño ultrasónico digital (60W) durante 1 hora, para eliminar todas las células vivas. Finalmente, se hizo una mezcla 1:1 (v/v) del extracto obtenido con acetato de etilo para la separación de fases como menciona (Khan et al., 2020). A este preparado se le llamará extracto madre, y a partir de él se hicieron las preparaciones para los ensayos de actividad biológica.

3.1.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

Se examinó la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos previamente de los cuatro medios de cultivo frente a los aislados de bacterias (*Ralstonia* sp. y *Erwinia* sp.) y los dos hongos (*Fusarium* sp. y *Pseudocercospora* sp.) obtenidos previamente en este trabajo.

Cada medio fue suplementado con el extracto madre a razón de una dosis de 5 ml/L de medio, ya sea AN o PDA. Con este medio se vertieron las placas tratadas. Como controles se usaron placas de AN para bacterias y PDA para hongos sin el extracto para evidenciar el efecto de los metabolitos producidos.

Se inocularon 5 µl de las suspensiones de células (1×10^5 cel/ml) y esporas (1×10^3 esp/ml) de cada microorganismo en placas de AN Y PDA, respectivamente. Este procedimiento general fue siguiendo la metodología de (Khan et al., 2020). Las placas se incubaron a 28°C durante 5 días. Se emplearon 32 tratamientos (Tabla 3) con 3 réplicas por cada tratamiento.

Se midieron los diámetros perpendiculares (mm) de las colonias de hongos y de las bacterias. Finalmente, para obtener el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial se usó la ecuación (2), donde A es el diámetro del control del patógeno sin el extracto y B es el diámetro de la colonia con el extracto:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad \text{ecuación (1)}$$

Los porcentajes de inhibición del crecimiento se compararon estadísticamente mediante ANOVA y las medias se separaron mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey ($p < 0,05$ de probabilidad) en el programa Statgraphics.

3.1.4. Ensayos cualitativos de enzimas líticas

Se utilizó la técnica de difusión radial en gel usada por (Schumacher & Schill, 1972) basada en que el extracto crudo (Tabla 4) obtenido fue inoculado en un medio de agar suplementado con una fuente de carbono única para cada cultivo: almidón, quitina y celulosa. Los medios inoculados fueron incubados a 28°C durante 24 h. Transcurrido este

tiempo se usó colorantes para determinar cualitativamente la presencia o ausencia de enzimas.

Tabla 3

Descripción de los tratamientos para la determinación de la actividad antimicrobiana

TRATAM.	MEDIO	CEPA PATÓGENO	CEPA <i>Trichoderma</i>
MT01	Cornmeal Broth	<i>Pseudocercospora</i>	<i>T. harzianum</i>
MT02	Cornmeal Broth	<i>Pseudocercospora</i>	<i>T. viride</i>
MT03	Cornmeal Broth	<i>Fusarium</i>	<i>T. harzianum</i>
MT04	Cornmeal Broth	<i>Fusarium</i>	<i>T. viride</i>
MT05	Cornmeal Broth	<i>Ralstonia</i>	<i>T. harzianum</i>
MT06	Cornmeal Broth	<i>Ralstonia</i>	<i>T. viride</i>
MT07	Cornmeal Broth	<i>Erwinia</i>	<i>T. harzianum</i>
MT08	Cornmeal Broth	<i>Erwinia</i>	<i>T. viride</i>
MT09	Sabouraud Broth	<i>Pseudocercospora</i>	<i>T. harzianum</i>
MT10	Sabouraud Broth	<i>Pseudocercospora</i>	<i>T. viride</i>
MT11	Sabouraud Broth	<i>Fusarium</i>	<i>T. harzianum</i>
MT12	Sabouraud Broth	<i>Fusarium</i>	<i>T. viride</i>
MT13	Sabouraud Broth	<i>Ralstonia</i>	<i>T. harzianum</i>
MT14	Sabouraud Broth	<i>Ralstonia</i>	<i>T. viride</i>
MT15	Sabouraud Broth	<i>Erwinia</i>	<i>T. harzianum</i>
MT16	Sabouraud Broth	<i>Erwinia</i>	<i>T. viride</i>
MT17	Potato Dextrose Broth	<i>Pseudocercospora</i>	<i>T. harzianum</i>
MT18	Potato Dextrose Broth	<i>Pseudocercospora</i>	<i>T. viride</i>
MT19	Potato Dextrose Broth	<i>Fusarium</i>	<i>T. harzianum</i>
MT20	Potato Dextrose Broth	<i>Fusarium</i>	<i>T. viride</i>
MT21	Potato Dextrose Broth	<i>Ralstonia</i>	<i>T. harzianum</i>
MT22	Potato Dextrose Broth	<i>Ralstonia</i>	<i>T. viride</i>
MT23	Potato Dextrose Broth	<i>Erwinia</i>	<i>T. harzianum</i>
MT24	Potato Dextrose Broth	<i>Erwinia</i>	<i>T. viride</i>
MT25	Richard's Broth	<i>Pseudocercospora</i>	<i>T. harzianum</i>
MT26	Richard's Broth	<i>Pseudocercospora</i>	<i>T. viride</i>
MT27	Richard's Broth	<i>Fusarium</i>	<i>T. harzianum</i>
MT28	Richard's Broth	<i>Fusarium</i>	<i>T. viride</i>
MT29	Richard's Broth	<i>Ralstonia</i>	<i>T. harzianum</i>
MT30	Richard's Broth	<i>Ralstonia</i>	<i>T. viride</i>
MT31	Richard's Broth	<i>Erwinia</i>	<i>T. harzianum</i>
MT32	Richard's Broth	<i>Erwinia</i>	<i>T. viride</i>

Tabla 4*Descripción de los extractos para los ensayos de enzimas líticas*

EXTRACTO	MEDIO DE CULTIVO	CEPA DE <i>Trichoderma</i>
EXT01	Cornmeal Broth	<i>T. harzianum</i>
EXT02	Sabouraud Broth	<i>T. harzianum</i>
EXT03	Potato Dextrose Broth	<i>T. harzianum</i>
EXT04	Richard's Broth	<i>T. harzianum</i>
EXT05	Cornmeal Broth	<i>T. viride</i>
EXT06	Sabouraud Broth	<i>T. viride</i>
EXT07	Potato Dextrose Broth	<i>T. viride</i>
EXT08	Richard's Broth	<i>T. viride</i>

CAPÍTULO IV: Resultados y Discusión

4.1. Análisis e Interpretación de Resultados

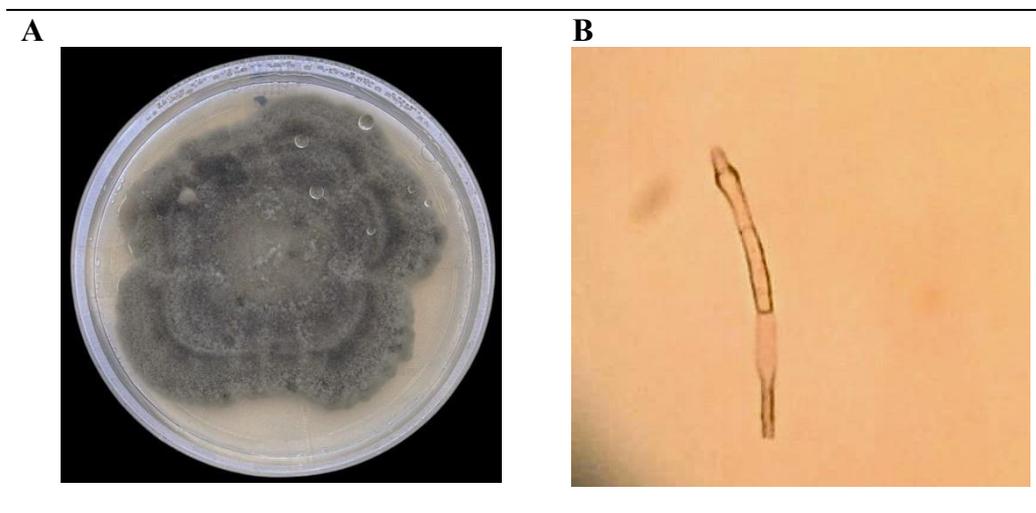
4.1.1. Microorganismos purificados de plantas sintomáticas de banano

Pseudocercospora sp. De los fragmentos de hojas se obtuvieron nueve aislamientos de hongos de los cuales siete solo tenían micelio estéril y no fue posible su identificación. Solo dos colonias mostraron la morfología que coincidía con la descripción del género *Pseudocercospora* sp. Las colonias aisladas en cultivo puro tuvieron un crecimiento lento (65 mm en 15 días) y mostraron coloración gris (630 French grey), forma esférica con bordes irregulares y una consistencia algodonosa (Figura 11A).

A nivel microscópico como se observa en la Figura 11B, se observó un conidióforo que es el resultado de la reproducción asexual y son septados. De un solo conidióforo pueden formarse cuatro conidios maduros.

Figura 11

Morfología de Pseudocercospora sp.

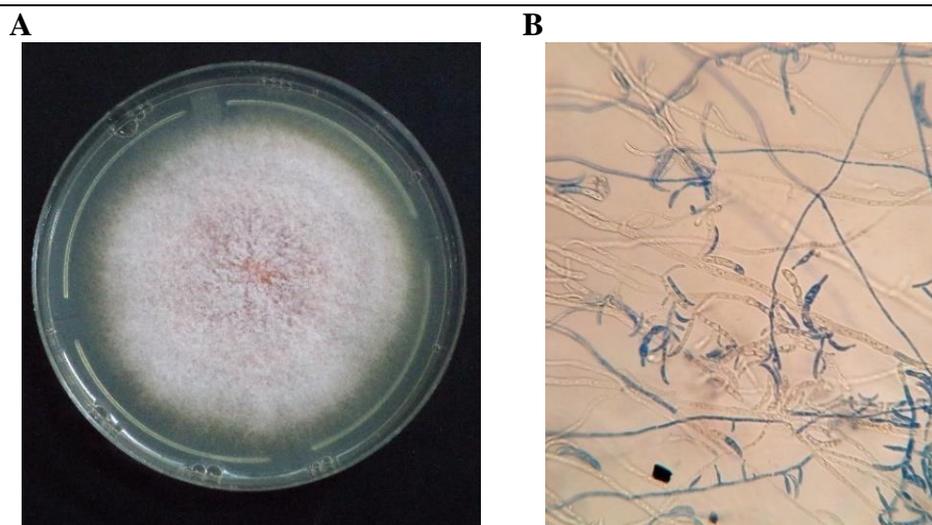


Nota. (A) Cultivo puro de *Pseudocercospora* sp. (B) Observación microscópica de un conidio de *Pseudocercospora* sp.

Fusarium sp. Se identificó *Fusarium* spp. por sus características de cultivo presentando micelio aéreo abundante y algodónoso de color blanco-durazno (369 Biscuit) con un tinte violeta (Figura 12A). A nivel microscópico se observó hifas hialinas septadas, fiálides cortas laterales, presencia de microconidias (elipsoidales, que no forman cadenas), macroconidias (fusiformes, moderadamente curvadas, septadas, puntiagudas en los extremos) y clamidosporas intercaladas o terminales en la hifa (Figura 12B).

Figura 12

Morfología de Fusarium sp.



Nota. (A) Cultivo puro de *Fusarium* sp. (B) Observación microscópica de las estructuras de *Fusarium* sp.

Ralstonia sp. En el caso de *Ralstonia* sp. se aisló la cepa virulenta de acuerdo a la coloración que toma por el cloruro de tetrazolio. También, se observaron otras colonias que se tiñen de color rojo oscuro que pueden ser cepas de *Ralstonia* no virulentas o a su vez cepas de otras bacterias. La cepa virulenta, se aisló en cultivo puro para su posterior caracterización (Figura 13A). En la Tabla 5 se observa la caracterización macro y microscópica (Figura 13B) de la bacteria.

Tabla 5

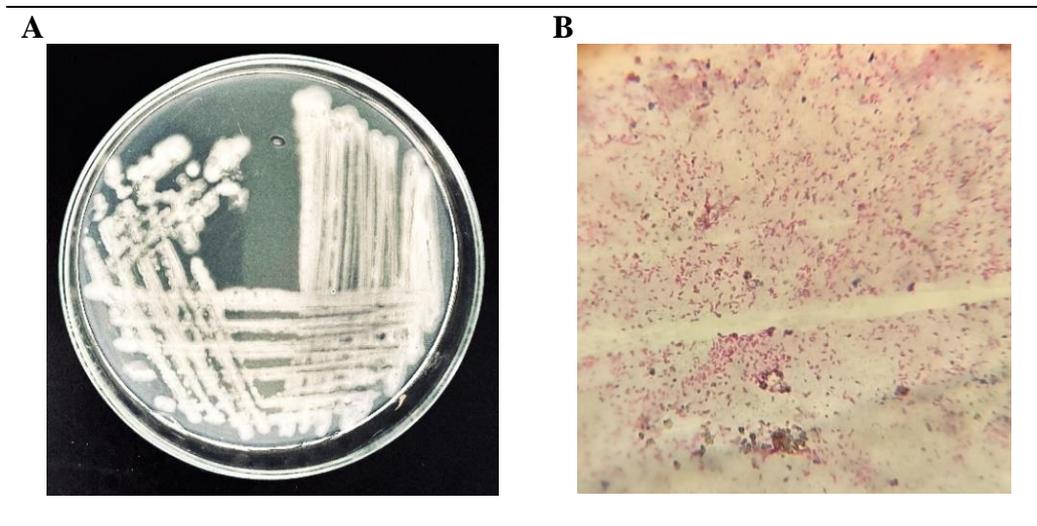
Características culturales y morfológicas de bacterias patógenas

CARACTERÍSTICA	<i>Ralstonia sp.</i>	<i>Erwinia sp.</i>
Color ^a	365 Vellum	384 Light Straw
Forma ^b	Entero	Entero
Elevación ^b	Convexo	Convexo
Margen ^b	Entero	Ondulado
Textura	Mucosa	Mucosa
Forma celular	Bacilo	Bacilo
Tinción de Gram	Gram -	Gram -

Nota. ^a British Standard Specification of Colours for Identification Coding and Special Purposes. ^b Referencia en Figura 1.

Figura 13

Caracterización macro y microscópica de Ralstonia sp.

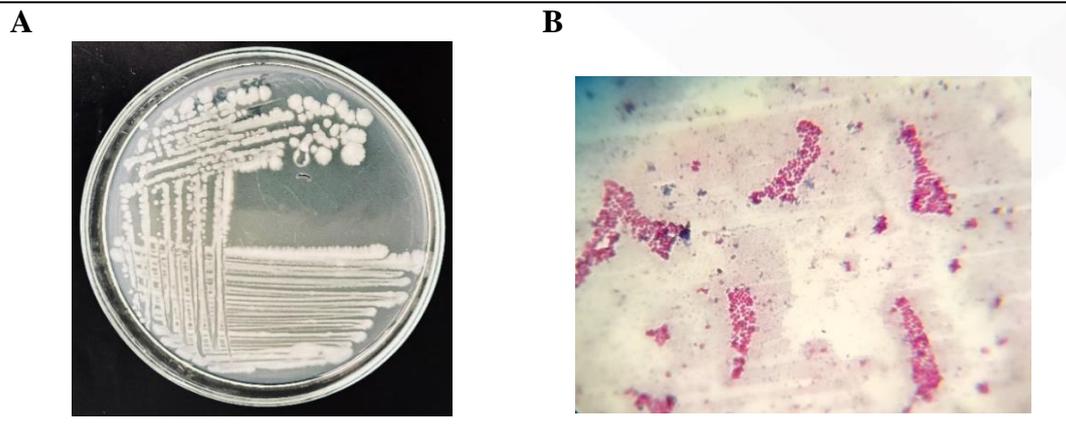


Nota. (A) Cultivo puro de *Ralstonia sp.* (B) Tinción de Gram de la bacteria pura.

Erwinia sp. En el caso de *Erwinia* se aisló la cepa que poseía la morfología coincidente con la del patógeno y se la purificó (Figura 14A) para su posterior caracterización macro y microscópica (Tabla 5).

Figura 14

Caracterización macro y microscópica de *Erwinia* sp.



Nota. (A) Cultivo puro de *Erwinia* sp. (B) Tinción de Gram de la bacteria.

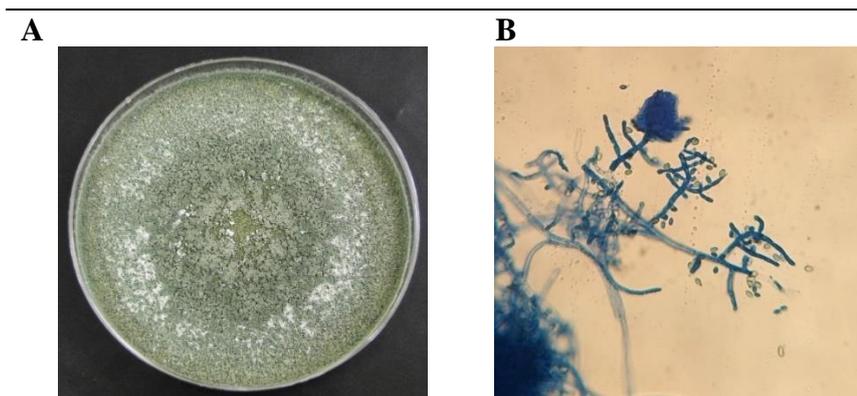
4.1.2. Metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp.

4.1.2.1. Características culturales de *Trichoderma* spp. en medio sólido

En medio sólido *Trichoderma harzianum* adopta un color de micelio blanco y eventualmente cambia a verde después de la esporulación (Figura 15A). Las esporas o conidias son subglobosas o citriformes. Los conidióforos presentan ramificaciones perpendiculares, tiene una apariencia piramidal. Las fiálides son asimétricas y delgadas (Figura 15B).

Figura 15

Morfología y estructuras microscópicas de conidióforos y conidias de *Trichoderma harzianum* en placas.

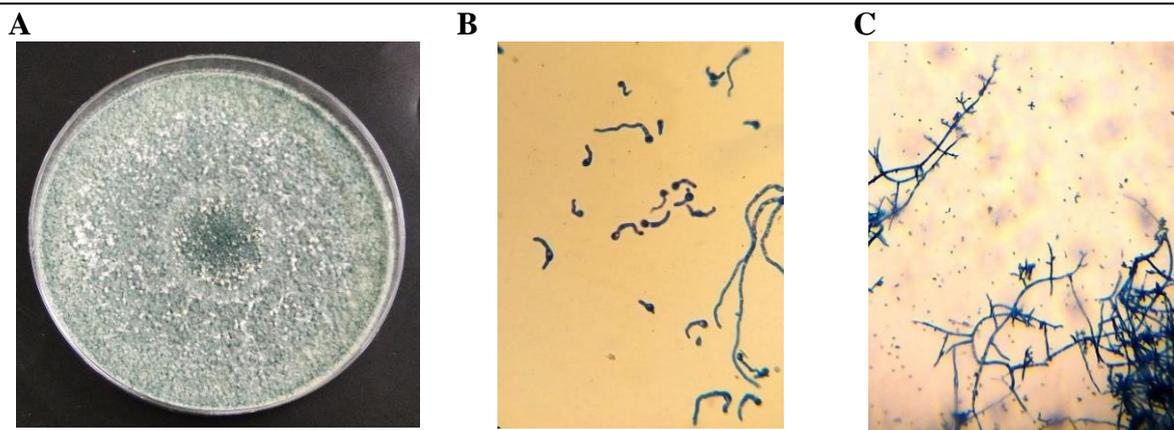


Nota. (A) *Trichoderma harzianum* en medio sólido. (B) Observación microscópica de *Trichoderma harzianum*.

Trichoderma viride adopta un color de micelio verde (Figura 16A). Las esporas o conidias son globosas (Figura 16B). Los conidióforos se ramifican piramidalmente, las ramas laterales cortas aparecen cerca de la punta y las más largas en la parte baja. Las fiálides son delgadas y se doblan irregularmente (Figura 16C).

Figura 16

Morfología de la colonia y estructuras microscópicas de conidióforos y conidias de *Trichoderma viride*



Nota. (A) *Trichoderma viride* en cultivo puro. (B) Tubo germinativo de *Trichoderma viride*. (C) Observación microscópica de estructuras.

4.1.2.2. Características culturales de *Trichoderma* spp. en medios líquidos

Se pudo observar que el medio de cultivo en el que mejor crecen las cepas es el Sabouraud Broth, y en el que menos crecen es en el Richard's Broth. También se observa que la cepa de *T. viride* esporula más que la cepa de *T. harzianum*. A los 21 días se observó una disminución en la cantidad de esporas de las dos cepas debido a la disminución de nutrientes en el medio como se observa en la Figura 17.

También se observó bajo el microscopio como se encontraba el micelio a los 21 días para la cepa de *T. harzianum* (Figura 18A) y para *T. viride* (Figura 18B) en todos los casos se observa las clamidosporas que produce *Trichoderma* en medio líquido.

Figura 17

Dinámica de la tasa de esporulación de *Trichoderma* spp. (ufc/ml) en medios líquidos a los 8 y 21 días.

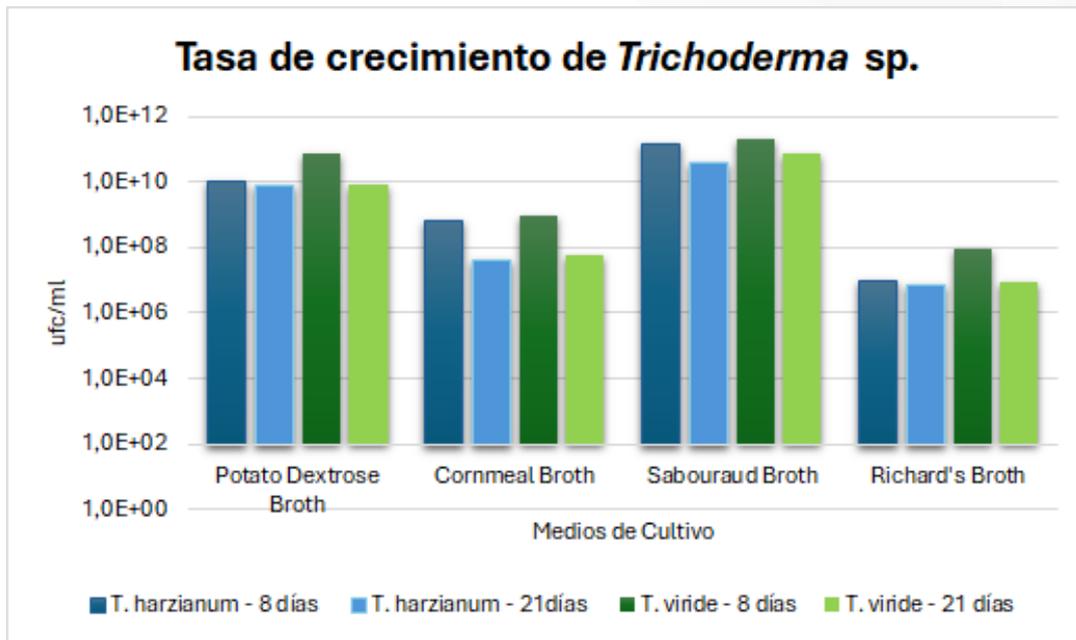
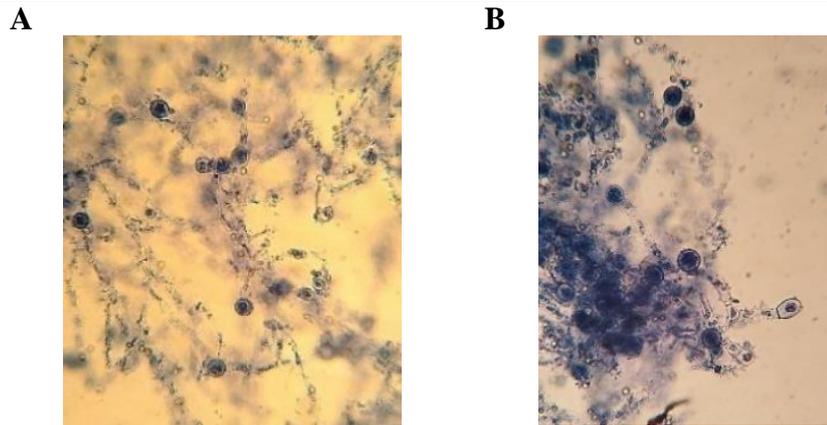


Figura 18

Observación de clamidosporas de *T. harzianum* y *T. viride*.



Nota. (A) Clamidosporas de *T. harzianum* (40X) (B) Clamidosporas de *T. viride* (40X).

4.1.2.3. Inhibición del crecimiento micelial por los metabolitos de *Trichoderma* spp.

En la Tabla 6 se observa el promedio del diámetro de crecimiento (mm) y el porcentaje de inhibición (%) para cada uno de los tratamientos.

Tabla 6*Datos del promedio del diámetro de crecimiento y porcentaje de inhibición en los tratamientos*

TRATAMIENTO	PROMEDIO DIAMETRO DE CRECIMIENTO (mm)	INHIBICIÓN (%)
MT01	19,8	20,7
MT02	20,2	19,3
MT03	56,0	9,7
MT04	55,2	11,0
MT05	15,0	-
MT06	14,8	1,1
MT07	20,0	-
MT08	20,0	-
MT09	19,5	22,0
MT10	18,0	28,0
MT11	53,3	28,9
MT12	55,0	26,7
MT13	14,0	6,7
MT14	14,7	2,2
MT15	20,0	-
MT16	20,0	-
MT17	19,7	21,3
MT18	19,3	22,7
MT19	55,0	11,3
MT20	53,0	14,5
MT21	15,0	-
MT22	15,0	-
MT23	20,0	-
MT24	17,8	10,8
MT25	22,7	9,3
MT26	20,7	17,3
MT27	60,0	3,2
MT28	55,0	11,3
MT29	15,0	-
MT30	15,0	-
MT31	20,0	-
MT32	17,0	15,0

En el análisis de varianza (Tabla 7) se puede observar que hubo diferencias en la respuesta de crecimiento de los patógenos a la acción de los metabolitos de las diferentes cepas y medios de cultivo. Estas diferencias se muestran al analizar la varianza de los datos según las diferentes fuentes de variación y sus interacciones. Nótese que todos los factores tienen un efecto significativo en la inhibición del crecimiento a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 7

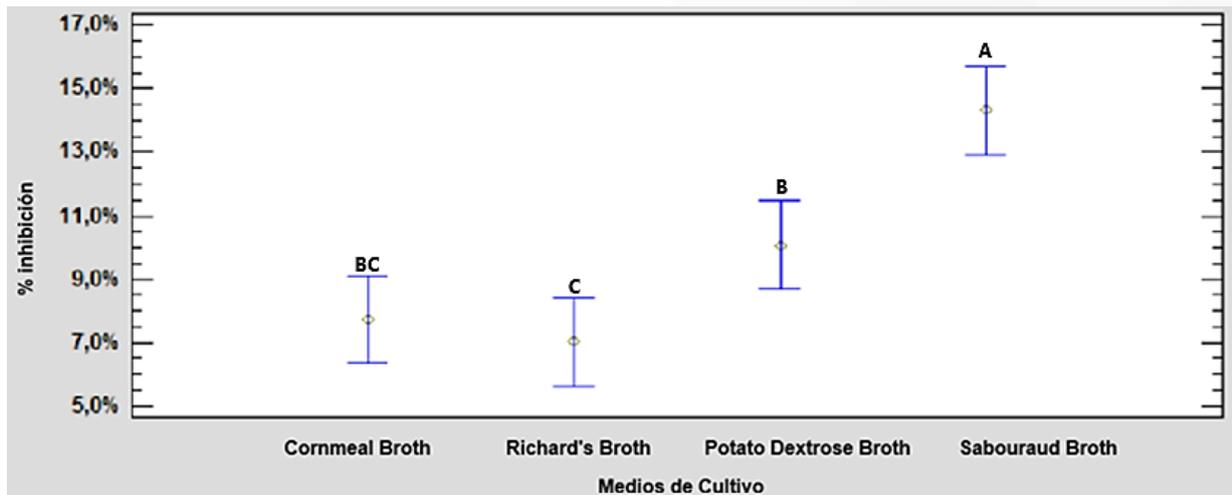
ANOVA para el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de por efectos de extractos de acetato de etilo

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	RAZÓN-F	VALOR-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Medio de cultivo	0,077975	3	0,0259917	19,43	0,0000
B: Cepa Patógeno	0,587505	3	0,195835	146,38	0,0000
C: Cepa <i>Trichoderma</i>	0,0206213	1	0,0206213	15,41	0,0002
INTERACCIONES					
AB	0,150223	9	0,0166915	12,48	0,0000
AC	0,0245661	3	0,0081887	6,12	0,0009
BC	0,0162618	3	0,00542059	4,05	0,0101
RESIDUOS	0,0976646	73	0,00133787		
TOTAL (CORREGIDO)	0,974817	95			

Inhibición de acuerdo al medio. Este procedimiento de comparación múltiple nos permitió determinar la diferencia significativa entre las medias a un nivel del 95% de confianza. Se han identificado 3 grupos homogéneos (Figura 19). El medio Richard's tiene una media baja para la producción de metabolitos secundarios. Se observa que el mejor medio de cultivo es el Sabouraud Broth, es decir este permitió que exista una mayor producción de metabolitos secundarios y por ende la inhibición de los patógenos es mucho mayor.

Figura 19.

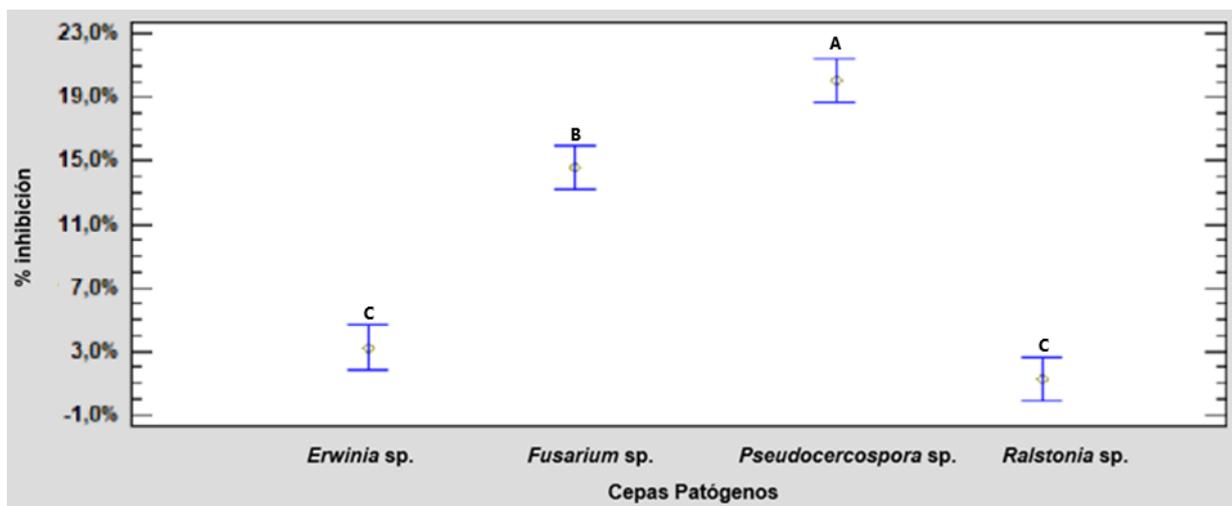
Separación de medias para porcentaje de inhibición de acuerdo al medio de cultivo



Inhibición por cepa de patógeno. Se determinó la diferencia significativa entre las medias a un nivel del 95% de confianza. Se formaron 3 grupos homogéneos. En la Figura 20 se observa que no hay diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición para las bacterias (*Ralstonia* y *Erwinia*). En el segundo grupo tenemos a *Fusarium* que si es controlado por los metabolitos secundarios. La mayor inhibición se produjo para el hongo *Pseudocercospora* en la mayoría de medios (Figura 16).

Figura 20

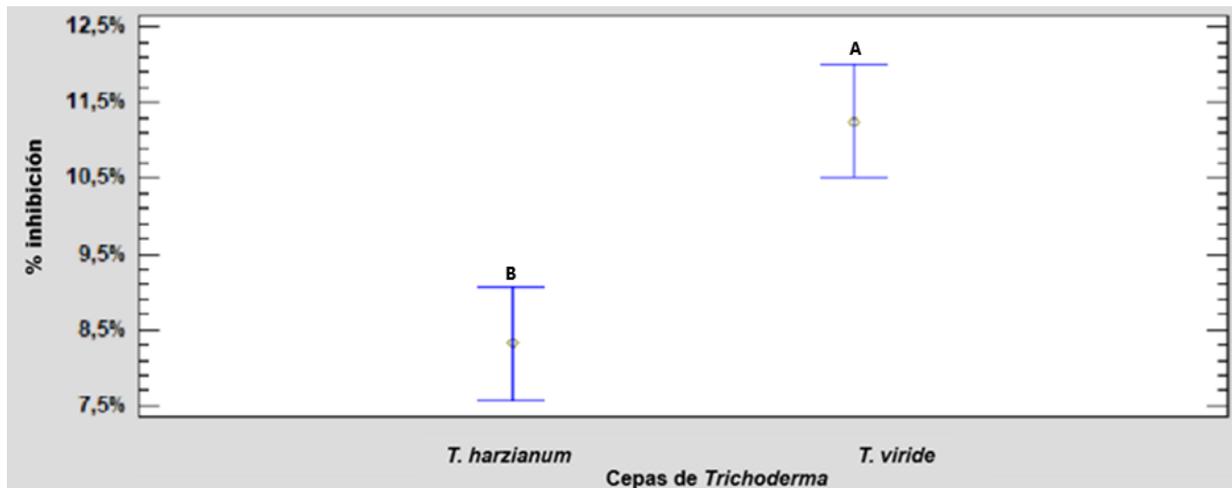
Separación de medias para la inhibición por patógeno



Inhibición por cepa de *Trichoderma*. Se determinó la diferencia significativa entre las medias a un nivel del 95% de confianza. En la Figura 21 se observa que existen dos grupos homogéneos, esto quiere decir, que hay diferencia significativa entre las dos cepas de *Trichoderma* utilizadas, siendo la cepa de *T. viride* la que más produce metabolitos secundarios.

Figura 21

Separación de medias para las cepas de *Trichoderma*



4.1.3. Presencia de enzimas líticas

En la Tabla 9 se puede observar los resultados de la actividad enzimática. Existe la presencia de enzimas amilolíticas, celulasas y quitinasas obtenidas a partir del Sabouraud Broth y Potato Dextrose Broth tanto para la cepa de *T. viride* y *T. harzianum*.

Tabla 8*Evaluación cualitativa de la actividad enzimática*

EXTRACTO	CELULOSA	ALMIDÓN	QUITINA
EXT01	-	-	-
EXT02	+	+	+
EXT03	+	+	+
EXT04	-	-	-
EXT05	-	-	-
EXT06	+	+	+
EXT07	+	+	+
EXT08	-	-	-

4.2. Discusión

El Ecuador al ser un país exportador de banano tiene grandes superficies de cultivos y la cantidad de ingresos que genera para el país es considerable. En la actualidad debido al cambio climático, el uso indiscriminado de agroquímicos y el mal manejo de este monocultivo ha causado que las enfermedades del banano sean cada vez más severas. Por tal motivo, es importante el manejo integral de enfermedades y la investigación de nuevas fuentes más amigables con el ambiente para el control de los patógenos.

Es así, que se aislaron patógenos del banano con el objetivo de buscar metabolitos generados por *Trichoderma* que puedan ser usados como un bioproducto que ayude a reducir el efecto negativo que generan los agroquímicos en el suelo, las fuentes de agua y en la salud de los trabajadores (Ortiz et al., 2020).

Una de las enfermedades de más importancia en el cultivo de banano es la Sigatoka negra en la cual el agente causal es un hongo pleomórfico, es decir que tiene un estado sexual o teleomorfo (*Mycosphaerella* sp.) y un asexual o anamorfo (*Pseudocercospora* sp.) que es la forma en la que es posible aislar a nivel de laboratorio (Alakonya et al., 2018). El género *Pseudocercospora* en banano está compuesto por un complejo de tres especies con síntomas similares <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1005904> Se logró aislar una DOS cepa de *Pseudocercospora* con la que se trabajó para las pruebas in vitro. Se aisló una cepa agresiva de *Fusarium* sp. que es el causante del Mal de Panamá, este hongo muy difícil de controlar ya que puede sobrevivir en el suelo por mucho tiempo y también por ser un patógeno vascular no puede ser controlado por agroquímicos no sistémicos (Buddenhagen, 2009). En cuanto a las bacterias *Ralstonia* y *Erwinia* fueron aisladas y caracterizadas para su posterior uso.

Al realizar la extracción con solventes orgánicos para los caldos de *Trichoderma* se utilizó acetato de etilo que permitió obtener actividades biológicas superiores para la extracción de metabolitos extracelulares e intracelulares (Patil & Chakranarayan, 2021).

Los datos del promedio de la tasa de esporulación de las dos cepas de *Trichoderma* muestran que el mejor medio de cultivo para el crecimiento de las cepas es el Sabouraud Broth (Maurya et al., 2017). Luego de evaluar los datos estadísticos tiene mucha relación con la cantidad de metabolitos que se producen en dicho medio, es decir, mientras mayor es la esporulación del hongo, más cantidad de metabolitos secundarios se producen y por ende la inhibición del crecimiento de patógenos es mayor.

También se observa que la cepa de *Trichoderma viride* esporula más que la cepa de *Trichoderma harzianum*, lo que tiene sentido al momento de realizar la separación de medias de las cepas, que nos indica que la cepa de *T. viride* produce más metabolitos que inhiben el crecimiento de los patógenos (Mishra & Khan, s. f.).

Finalmente, se observa que el patógeno que más se controló con los extractos de *Trichoderma* fue *Pseudocercospora* sp. seguido del control para *Fusarium* sp., lo que nos demuestra la capacidad antifúngica de *Trichoderma* (Mukhopadhyay & Kumar, 2020). El mejor tratamiento para los hongos es el MT10 que es para el control de *Pseudocercospora* con el extracto obtenido de *T. viride* proveniente del medio Sabouraud.

Si lo comparamos con los datos de inhibición de bacterias no tuvo mucho efecto, los porcentajes de inhibición son bajos, pero existen algunos tratamientos especialmente de la cepa de *T. viride* que tienen un efecto bactericida.

El ensayo de enzimas amilolíticas, celulasas y quitinasas nos muestra que por esta razón se obtuvo un mejor desempeño de los extractos con los hongos ya que estas enzimas

degradan la pared de los hongos que están compuestas de quitana y glucanos (Gow et al., s. f.).

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

1. La identificación de las cepas de microorganismos patógenos con síntomas en el cultivo de banano es esencial para un control efectivo de las enfermedades. La identificación de los patógenos fue posible a partir del diagnóstico microbiológico. La información recolectada no solo permite una integración detallada de la dinámica de las enfermedades, sino que también proporciona la base para el desarrollo de estrategias de control y prevención específicas que generalmente aumentan la producción y sostenibilidad de este cultivo.
2. El uso de diferentes formulaciones de caldos de fermentación permitió obtener una mayor cantidad de biomasa y una cantidad considerable de metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* spp. Las cepas utilizadas fueron fundamentales para obtener extractos que de alguna manera tienen potencial para biocontrol. Esta investigación promoverá la promoción de prácticas agrícolas sostenibles en el cultivo de banano.
3. La inhibición del crecimiento micelial de microorganismos asociados a enfermedades en el cultivo de banano, no solo mostró los beneficios de los extractos metabólicos de *Trichoderma* spp, sino también su efecto en la disminución del crecimiento de patógenos causantes de enfermedades. Los resultados presentados mostraron principalmente que los metabolitos secundarios tienen propiedades antifúngicas que pueden ser aprovechadas en la formulación de productos biológicos. Por esta razón, no solo se resalta la importancia de *Trichoderma* como un biocontrolador, sino también como una vía sostenible para reducir el uso de agrquímicos.

5.2. Recomendaciones

- 1.** Determinar químicamente los tipos de metabolitos secundarios que se extrajeron en el presente estudio.
- 2.** Concentrar las moléculas obtenidas y probar distintas dosis a nivel de laboratorio y en campo.
- 3.** Finalmente, se requiere de técnicas moleculares que nos permitan buscar genes de inhibición contra patógenos con el objetivo de desarrollar un nuevo bioproducto que puedan ser utilizado eficazmente contra un espectro diverso de infecciones de plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar-Ancota, R., Ruiz, W. R., Morales-Pizarro, A., Rafael-Rutte, R., Tirado-Lara, J., Saucedo-Bazalar, M., Tuesta-Albán, C., Apaza-Apaza, S., & Teodor, K. K. (2021). Soft rot in organic banana pseudostem (Musasp): Symptomatology, cultural and biochemical characterization, pathogenicity, and management alternatives. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 571-578. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.061>

Alakonya, A. E., Kimunye, J., Mahuku, G., Amah, D., Uwimana, B., Brown, A., & Swennen, R. (2018). Progress in understanding *Pseudocercospora* banana pathogens and the development of resistant *Musa* germplasm. *Plant Pathology*, 67(4), 759-770. <https://doi.org/10.1111/ppa.12824>

Alvarez, J., Rodríguez, P., & Marín, M. (2008). Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agroecosistemas bananeros de Colombia. *Tropical Plant Pathology*, 33.

Arzate-Vega, J. (2006). *Antagonismo de Trichoderma spp. Sobre Mycosphaerella fijiensis Morelet, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (Musa sp.) in vitro e Invernadero.*

Awad, N. E., Kassem, H. A., Hamed, M. A., El-Feky, A. M., Elnaggar, M. A. A., Mahmoud, K., & Ali, M. A. (2018). Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*. *Mycology*, 9(1), 70-80. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1423126>

Błaszczak, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisińska, J., & Jędrzycka, M. (2014). *Trichoderma* spp. – Application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of Plant Protection Research*, 54(4), 309-317. <https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0047>

Blomme, G., Dita, M., Jacobsen, K. S., Pérez, L., Molina, A., Ocimati, W., Poussier, S., & Prior, P. (2017). Bacterial Diseases of Bananas and Enset: Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. *Frontiers in Plant Science*, 8.

Breakwell, D., Woolverton, C., MacDonald, B., Smith, K., & Robison, R. (2016). Colony Morphology Protocol. *American Society for Microbiology*.

Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Gómez-Lama, C., & Mercado-Blanco, J. (2019). Biological Control Agents Against Fusarium Wilt of Banana. *Frontiers in Microbiology*, 10.

Buddenhagen, I. (2009). Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense and history of introduction of 'tropical race 4' to better manage banana production. *Proceedings of the International ISHS-ProMusa Symposium on Recent Advances in Banana Crop Protection for Sustainable Production and Improved Livelihoods.*, *Acta Horticulturae* 828.

Churchill, A. C. L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: Progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 307-328. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x>

Dapoux, H. (1983). *Classification Des Champignons Phytopathogènes* (Vol. 2). I.N.R.A.

Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T.-H. (1993). *Compendium of Soil Fungi* (Vol. 1). IHW-Verlag.

- FAO. (2023). *Banano. Análisis del mercado 2022*.
- Fouré, E. (1987). Varietal Reactions of Bananas and Plantain to Black Leaf Streak Disease. *Banana and Plantain Breeding Strategies: ACIAR Proceedings*, 21.
- García, R. O., Kerns, J. P., & Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Quick Diagnostic Guide. *Plant Health Progress*, 20(1), 7-13. <https://doi.org/10.1094/PHP-04-18-0015-DG>
- Gow, N., Latge, J.-P., & Munro, C. (s. f.). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectrum*, 5(3). <https://doi.org/doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>.
- Henriques, W., Jeffers, R. D., Lacher, T. E., & Kendall, R. J. (1997). Agrochemical use on banana plantations in Latin America: Perspectives on ecological risk. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(1), 91-99. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160110>
- Hutter, H.-P., Poteser, M., Lemmerer, K., Wallner, P., Kundi, M., Moshhammer, H., & Weitensfelder, L. (2021). Health Symptoms Related to Pesticide Use in Farmers and Laborers of Ecological and Conventional Banana Plantations in Ecuador. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 1126.
- Jangir, P., Mehra, N., Sharma, K., Singh, N., Rani, M., & Kapoor, R. (2021). Secreted in Xylem Genes: Drivers of Host Adaptation in *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 12:628611. <https://doi.org/doi:10.3389/fpls.2021.628611>
- Jogaiah, S., & Abdelrahman, M. (2019). *Bioactive Molecules in Plant Defense: Signaling in Growth and Stress* (1era edición). Springer.
- Khan, R. A. A., Najeeb, S., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Li, Y., & Xie, B. (2020). Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. Against Phytopathogenic Bacteria and Root-Knot Nematode. *Microorganisms*, 8(3), 401. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030401>
- Manzo Gilberto, Guzmán, S., Rodríguez, C., James, A., & Orozco, M. (2004). Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(001), 87-96.
- Mesa Vanegas, A. M., Marín Pavas, D. A., & Calle Osorno, J. (2020). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. Y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 1-13. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Mostafa, H. S. (2021). Banana plant as a source of valuable antimicrobial compounds and its current applications in the food sector. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15854>
- Mukhopadhyay, R., & Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: A beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>
- Obrador-Sánchez, J. A., Tzec-Simá, M., Canto-Canché, B., & Higuera-Ciapara, I. (2017). Técnicas para el aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas de *Ralstonia*

solanacearum relacionadas a Moko del plátano. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1705-1>

Oliver, R. (2024). *Agrios' Plant Pathology* (6ta edición). Academic Press.

Ortiz, J., Abril, M., Pelaez, M., & Salamea, T. (2020). Biomass yield and carbon abatement potential of banana crops (*Musa* spp.) in Ecuador. *Environmental Science and Pollution Research*.

Patil, A. S., & Chakranarayan, M. R. (2021). *PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF TRICHODERMA METABOLITES: A NEW APPROACH FOR SELECTIVE BIOREMEDIATION*.

Pegg, K., Lindel, C., O'neall, W., & Turner, D. (2019). The Epidemiology of Fusarium Wilt of Banana. *Frontiers in Plant Science*, 10:1395. <https://doi.org/doi:10.3389/fpls.2019.01395>

Ploetz, R., Freeman, S., Konkol, J., Al-Abed, A., Naser, Z., Shalan, K., Barakat, R., & Israeli, Y. (2015). Tropical race 4 of Panama disease in the Middle East. *Phytoparasitica*, 43(3), 283-293. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0470-5>

Priac, A., Badot, P.-M., & Crini, G. (2017). Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. *Comptes Rendus. Biologies*, 340(3), 188-194. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.01.002>

Robinson, J., & Galán, V. (2010). *Bananas and Plantains* (2da edición, Vol. 19). Mundi Prensa.

Roca, A., & Matilla, M. A. (2023). Microbial antibiotics take the lead in the fight against plant pathogens. *Microbial Biotechnology*, 16(1), 28-33. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14185>

Schumacher, G., & Schill, W.-B. (1972). Radial Diffusion in Gel for Micro Determination of Enzymes. *Analytical biochemistry*, 48.

Soto, M. (2014). *Bananos I: Conceptos básicos* (1era ed.). Editorial Tecnológico de Costa Rica.

Vargas, J., Wang, A., & Muñoz, M. (2022). Microorganismos asociados a la enfermedad conocida como pudrición suave de banano (*Musa* sp.) y alternativas de control microbiológicas y químicas a nivel in vitro. *Agronomía Costarricense*, 46(2).

Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. For agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2020.09.003>

ANEXOS

Anexo 1

Medios de cultivo

SABOURAUD BROTH

COMPONENTES	CANTIDAD
Glucosa	40,00 g
Peptona	10,00 g
Agua destilada	1000 ml

POTATO DEXTROSE BROTH

COMPONENTES	CANTIDAD
Almidón de papa	4,00 g
Potato Dextrose Broth	20,00 g
Agua destilada	1000 ml

CORNMEAL BROTH

COMPONENTES	CANTIDAD
Extracto de levadura	4,00 g
Fosfato dibásico de potasio	1,00 g
Sulfato de magnesio hepta hidratado	0,50 g
Harina de maíz	15,00 g
Agua destilada	1000 ml

RICHARD'S BROTH

COMPONENTES	CANTIDAD
Peptona	10,00 g
K ₂ HPO ₄	5,00 g
Mg(SO ₄).7H ₂ O	2,50 g
Cloruro de hierro	0,02 g
Sacarosa	50,00 g
Agua destilada	1000 ml

AGAR NUTRITIVO (AN)

COMPONENTES	CANTIDAD
Extracto de carne	3,00 g
Peptona	5,00 g
Agar	15,00 g
Agua destilada	1000 ml

AGAR PAPA DEXTROSA (PDA)

COMPONENTES	CANTIDAD
Almidón de papa	4,00 g
Potato Dextrose Broth	20,00 g
Agar	15,00 g
Agua destilada	1000 ml

MEDIO SMSA

COMPONENTES	CANTIDAD
Peptona	10,00 g
Casaminoácidos	1,00 g
Glucosa	5,00 g
Bacto agar	17,00 g
Polimyxin sulfato	100,00 mg
Cristal violeta	5,00 mg
Bacitracina	25,00 mg
Penicilina	0,50 mg
Agua destilada	1000 ml

MEDIO SMSA MODIFICADO

COMPONENTES	CANTIDAD
Peptona	10,00 g
Casaminoácidos	1,00 g
Glucosa	5,00 g
Bacto agar	17,00 g
Polimyxin sulfato	100,00 mg
Cristal violeta	5,00 mg
Bacitracina	25,00 mg
Penicilina	0,50 mg
Cloruro de tetrazolio	50,00 mg
Agua destilada	1000 ml
