



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE GUAYAQUIL

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE BANANO (*MUSA SPP.*)

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

AUTORAS:

LUCIANA MOLINARI MENDOZA

EMILY ANABELLA QUINTANA JURADO

TUTORA:

MSc. ANGELA PACHECO FLORES DE VALGAZ

GUAYAQUIL - ECUADOR

2025

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotras, **Luciana Molinari Mendoza** con documento de identificación N° 0925440232 y **Emily Anabella Quintana Jurado** con documento de identificación N° 0944103753; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 3 de febrero del año 2025

Atentamente,



Luciana Molinari Mendoza
CI: 0925440232



Emily Anabella Quintana Jurado
CI: 0944103753

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotras, **Luciana Molinari Mendoza** con documento de identificación N° 0925440232 y **Emily Anabella Quintana Jurado** con documento de identificación N° 0944103753, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE BANANO (*MUSA SPP.*)** el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 3 de febrero del año 2025

Atentamente,



Luciana Molinari Mendoza

CI: 0925440232



Emily Anabella Quintana Jurado

CI: 0944103753

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Angela Pacheco Flores De Valgaz** con documento de identificación N° 0930726112, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE BANANO (*MUSA SPP.*)**, realizado por **Luciana Molinari Mendoza** con documento de identificación N° 0925440232 y **Emily Anabella Quintana Jurado** con documento de identificación N° 0944103753 obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 3 de febrero del año 2025

Atentamente,



Angela Pacheco Flores De Valgaz

CI: 0930726112

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **María Gabriela Maridueña Zavala** con documento de identificación N° 0923210884, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE BANANO (*MUSA SPP.*)** realizado por **Luciana Molinari Mendoza** con documento de identificación N° 0925440232 y **Emily Anabella Quintana Jurado** con documento de identificación N° 0944103753, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 3 de febrero del año 2025

Atentamente,



María Gabriela Maridueña Zavala

CI: 0923210884

Dedicatoria Luciana Molinari

Dedico esta tesis a mi abuelo Víctor, quien me enseñó con su ejemplo que el esfuerzo y la dedicación son las claves para alcanzar cualquier meta.

Quiero agradecer a mi familia, sobre todo a mis padres, Carlos y Mayte, por estar conmigo en cada momento de mi vida y brindarme su apoyo incondicional.

A mis amigos les agradezco por estar a mi lado en las buenas y en las malas a lo largo de este proceso. Me llevo los mejores recuerdos y el cariño de cada momento que he pasado con ustedes.

Dedicatoria Emily Quintana

Dedico esta tesis a las personas más especiales para mí: mis padres. Ellos han logrado brindarme una excelente educación siempre a lo largo de mi vida. Gracias por el apoyo y reconocimiento de que soy una persona capaz de lograr cada meta que se proponga, este logro es tan suyo como mío. Mi más profundo agradecimiento por estar aquí, en esta etapa tan importante para mí.

Agradecimientos

Agradecemos al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador de la Escuela Superior Politécnica del Litoral por el financiamiento en este proyecto.

Gracias a nuestras tutoras Ing. Angela Pacheco MSc., e Ing. Gabriela Maridueña MSc. por su paciencia infinita y por brindarnos constante soporte y acompañamiento desde el inicio.

Agradecemos al personal docente de la Universidad Politécnica Salesiana en especial al Ing. Jaime Naranjo Morán por brindarnos las mejores enseñanzas siempre.

Y agradecemos especialmente a nuestros amigos, que en estos cuatro años se han convertido en una segunda familia para nosotras y han hecho de esta experiencia un camino lleno de risas y recuerdos inolvidables.

Resumen

Mediante la presente investigación se buscó identificar diferencias en la efectividad de los microorganismos dependiendo de su nicho ecológico y del fitopatógeno enfrentado. El cultivo de banano (*Musa* spp.) es una de las principales actividades económicas de Ecuador, contribuyendo significativamente al sector comercial y a la generación de empleos locales. Sin embargo, este sector afronta una problemática debido a la incidencia de fitopatógenos como *Ralstonia solanacearum* causante de la enfermedad del Moko, *Colletotrichum musae* responsable de la Antracnosis y *Pseudocercospora fijiensis* agente causal de la Sigatoka negra. Estas enfermedades generan altas pérdidas en las ganancias económicas al reducir la calidad de producción. En este contexto, el presente estudio evaluó la capacidad inhibitoria de microorganismos benéficos como bacterias provenientes de suelos antárticos, bacterias extraídas de fermentados de cacao y hongos aislados del Bosque Protector Prosperina con el objetivo de identificar cepas que actúen como agentes de biocontrol y sean consideradas como alternativas sostenibles en reemplazo de agroquímicos convencionales. Se implementaron ensayos *in vitro* de confrontación directa entre los microorganismos seleccionados y los fitopatógenos mencionados, utilizando metodologías específicas para cada tipo de interacción (bacteria-bacteria, hongo-bacteria, y hongo-hongo). Los resultados reportaron que el efecto antagonista se halló principalmente en las cepas bacterianas provenientes de la fermentación del cacao y hongos, de los géneros *Bacillus* spp., *Lactiplantibacillus* sp., *Acetobacter* sp, *Ralstonia* sp. y *Trichoderma* spp.

Palabras clave: Banano, Biocontrol, Fitopatógenos, Microorganismos benéficos.

Abstract

This research sought to identify differences in the effectiveness of microorganisms depending on their ecological niche and the phytopathogen faced. The cultivation of bananas (*Musa* spp.) is one of the main economic activities in Ecuador, contributing significantly to the commercial sector and the generation of local jobs. However, this sector faces a problem due to the incidence of phytopathogens such as *Ralstonia solanacearum* causing Moko disease, *Colletotrichum musae* responsible for anthracnose and *Pseudocercospora fijiensis* causal agent of black Sigatoka. These diseases generate high losses in economic profits by reducing the quality of production. In this context, the present study evaluated the inhibitory capacity of beneficial microorganisms such as bacteria from Antarctic soils, bacteria extracted from cocoa ferments and fungi isolated from the Prosperina Protective Forest with the aim of identifying strains that act as biocontrol agents and are considered as sustainable alternatives to conventional agrochemicals. In vitro assays were implemented for direct confrontation between the selected microorganisms and the aforementioned phytopathogens, using specific methodologies for each type of interaction (bacteria-bacteria, fungus-bacteria, and fungus-fungus). The results reported that the antagonistic effect was found mainly in bacterial strains from the fermentation of cocoa and fungi, of the genera *Bacillus* spp., *Lactiplantibacillus* sp., *Acetobacter* sp., *Ralstonia* sp. and *Trichoderma* spp.

Keywords: Banana, Biocontrol, Phytopathogens, Beneficial Microorganisms.

Índice de contenido

Capítulo 1	1
Antecedentes	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Planteamiento del problema	2
1.3 Justificación.....	3
1.4 Objetivos	3
Capítulo 2	5
Marco Teórico	5
2.1 Cultivo de banano (<i>Musa</i> spp.)	5
2.2 Distribución global.....	5
2.3 Importancia económica	6
2.4 Morfología y ciclo de vida	6
2.5 Principales fitopatógenos que afectan al cultivo de banano.....	7
2.5.1 <i>Ralstonia solanacearum</i>	7
2.5.2 <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	8
2.5.3 <i>Colletotrichum musae</i>	9
2.6 Control biológico mediado por microorganismos.....	10
2.6.1 Hongos del género <i>Trichoderma</i> spp	11
2.6.2 Bacterias del género <i>Bacillus</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp	11

2.6.3 Bacterias aisladas de la fermentación del cacao: diversidad y potencial bioactivo	12
2.6.4 Microorganismos antárticos	13
2.7 Medios de cultivo	13
2.7.1 Medio casamino acid peptone glucose (CPG)	13
2.7.2 Medio trypticase soy agar (TSA)	14
2.7.3 Medio potato dextrose agar (PDA)	14
2.8 Prueba de enfrentamiento dual	14
Capítulo 3	15
Materiales y Métodos	15
3.1 Tipo de diseño: Exploratorio	15
3.2 Reactivación de microorganismos.....	16
3.2.1 Condiciones de siembra de microorganismos	16
3.2.2 Proceso de reactivación de bacterias y hongos	17
3.3 Metodologías para los enfrentamientos antagónicos preliminares y finales.....	18
3.3.1 Enfrentamientos preliminares <i>Ralstonia solanacearum</i>	18
3.3.2 Enfrentamientos finales de <i>Ralstonia solanacearum</i>	19
3.3.3 Enfrentamientos preliminares <i>Colletotrichum musae</i>	19
3.3.4 Enfrentamientos de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	21
3.4 Criterios de selección preliminar.....	22
3.5 Registro de datos	22
3.6 Análisis estadístico	23

Capítulo 4	24
Resultados y discusión	24
4.1. Resultados contra el patógeno <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
4.1.1. Enfrentamiento de bacterias antárticas contra el patógeno <i>R. Solanacearum</i>	24
4.1.2 Enfrentamiento de bacterias extraídas de la fermentación del cacao contra el patógeno <i>R. Solanacearum</i>	25
4.1.3 Enfrentamiento de los hongos benéficos extraídos del Bosque protector Prosperina contra el patógeno <i>R. Solanacearum</i>	27
4.2 Resultados contra el patógeno <i>Colletotrichum musae</i>	31
4.2.1 Enfrentamiento de bacterias benéficas antárticas contra el patógeno <i>Colletotrichum musae</i>	31
4.2.2 Enfrentamiento de bacterias benéficas extraídas de la fermentación del cacao contra el patógeno <i>Colletotrichum musae</i>	33
4.2.3 Enfrentamiento de los hongos benéficos extraídos del Bosque protector Prosperina contra el patógeno <i>Colletotrichum musae</i>	36
4.3 Resultados contra el patógeno <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	38
4.3.1 Enfrentamiento de bacterias de bacterias antárticas benéficas contra el patógeno	38
<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	38
4.3.2 Enfrentamiento de bacterias benéficas extraídas de la fermentación del cacao	40
contra el patógeno <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	40
4.3.3 Enfrentamiento de los hongos benéficos extraídos del Bosque protector Prosperina contra el patógeno <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	42
Capítulo 5	45

Conclusiones y recomendaciones	45
5.1 Conclusión.....	45
5.2 Recomendaciones.....	46

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos benéficos por evaluar y número de cepas.	15
Tabla 2. Nombre científico de los patógenos de estudio y el nombre común de la enfermedad que producen.	16
Tabla 3. Bacterias con valores significativos	27
Tabla 4. Diámetros de inhibición al tercer día del enfrentamiento de <i>R. solanacearum</i> frente a bacterias fermentadoras de cacao.	27
Tabla 5. Evaluación de respuesta antagónica de <i>T. inhamatum</i> frente a <i>R. solanacearum</i>	29
Tabla 6. Evaluación de respuesta antagónica de <i>T. spirale</i> frente a <i>R. solanacearum</i>	30
Tabla 7. Evaluación cualitativa del efecto inhibitorio en bacterias antárticas frente a <i>C. musae</i>	33
Tabla 8. Valores de significancia de la prueba estadística ANOVA	35
Tabla 9. Valor <i>p</i> de la prueba de Tukey	35
Tabla 10. Evaluación de respuesta antagónica de <i>T. inhamatum</i> frente a <i>C. musae</i>	37
Tabla 11. Evaluación cualitativa del efecto inhibitorio en bacterias antárticas frente a <i>P. fijiensis</i>	39
Tabla 12. Evaluación cualitativa del efecto inhibitorio en bacterias de cacao frente a <i>P. fijiensis</i>	41
Tabla 13. Evaluación de respuesta antagónica de hongos benéficos frente a <i>P. fijiensis</i>	43

Índice de figuras

Figura 1. Morfología de la planta de banano <i>Musa</i> spp. (A) Lámina, (B) Racimo, (C) Inflorescencia, (D) Pseudotallo, (E)Hijuelo, (F)Raíces y rizoma, (G) Pecíolo.	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Ralstonia solanacearum</i> (A) Bacteria patógena situada en suelo, (B) Fijación y penetración a través de raíces y aberturas naturales, (C) Colonización del tejido xilema causando obstrucción y desencadenando marchitez progresiva.	8
Figura 3. Ciclo infeccioso de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> .(A) Diseminación de ascosporas por medio del viento, (B) Infección y desarrollo en planta hospedera, (C) Colonización interna en célula vegetal que producirá estrías necróticas en hojas.	9
Figura 4. <i>Pseudocercospora fijiensis</i> en medio de cultivo PDA. Se observa micelio de textura algodonosa color rosa.	9
Figura 5. <i>Colletotrichum musae</i> . Micelio de apariencia algodonosa color naranja.	10
Figura 6. Proceso general de reactivación de microorganismos (1) Extracción de MO crioconservado a -80°C, (2) Toma de muestra con asa de siembra estéril, (3) Siembra por estriado en medio de cultivo, (4) Incubación en condiciones óptimas.	18
Figura 7. Evaluación preliminar entre <i>R. solanacearum</i> frente a bacterias benéficas (1) Siembra por estriado de bacteria patógena, (2) Preparación de los pocillos, (3) Inoculación de la cepa benéfica.	19
Figura 8. Ubicación de microorganismos para el enfrentamiento preliminar de <i>R. solanacearum</i> contra hongos benéficos.	19
Figura 9. Ubicación de los microorganismos para evaluación del hongo patógeno y bacterias benéficas.	20
Figura 10. Ubicación de los microorganismos para la evaluación preliminar del hongo <i>C. musae</i> , contra los hongos benéficos.	21
Figura 11. Esquema del enfrentamiento de <i>P. fijiensis</i> contra bacterias benéficas.	22
Figura 12. Esquema del enfrentamiento de <i>P. fijiensis</i> contra hongos filamentosos.	22
Figura 13. Ensayo de antagonismo entre cepas bacterianas antárticas y <i>Ralstonia solanacearum</i> . Se observan las placas sembradas con <i>R. solanacearum</i> enfrentada a	

diferentes cepas antárticas, (a) *Leifsonia antarctica*, (b) *Chryseobacterium* sp., (c) *Psychrobacter glacincola*, (d) *Pseudomonas brenneri*, (e) *Filibacter* sp., (f) *Pseudomonas psychrophile*, inoculadas en el centro. 25

Figura 14. Medida del halo de inhibición obtenida el día uno en el enfrentamiento de las bacterias fermentadoras de cacao para el control de *R. solanacearum*..... 28

Figura 15. Medida del halo de inhibición obtenida el día tres en el enfrentamiento de las bacterias fermentadoras de cacao para el control de *R. solanacearum*..... 28

Figura 16. Gráfica de barras comparativa del diámetro del control (micelio de *Trichoderma inhamatum* solo) y el diámetro de *Trichoderma inhamatum* en el enfrentamiento. 30

Figura 17. Gráfica de barras comparativa del diámetro del control (micelio de *Trichoderma spirale* solo) y el diámetro de *Trichoderma spirale* en el enfrentamiento. ... 31

Figura 18. Enfrentamiento individual contra *R. solanacearum* in vitro. (A) *Trichoderma spirale*, (B) Control *Trichoderma spirale*, (D) *Trichoderma inhamatum*, (D)Control *Trichoderma inhamatum*. 32

Figura 19. Evaluación entre *C. musae* y cepas antárticas, al cuarto día de enfrentamiento en medio de cultivo. Se presentan imágenes tomadas desde la parte superior e inferior de la misma placa Petri para observar la interacción entre los microorganismos. (A) *Pseudomona yamanorum* vista desde la parte superior de la placa, (B) *Pseudomona yamanorum* vista desde la parte inferior. (C) *Pseudomona kitaguniensis* vista desde la parte superior de la placa, (D) *Pseudomona kitaguniensis* vista desde la parte inferior, (E)*Streptomyces norijiensis* vista desde la parte superior de la placa, (F) *Streptomyces norijiensis* vista desde la parte inferior. 34

Figura 20. Gráfica de cajas y bigotes del diámetro de *C. musae* enfrentado por las bacterias fermentadoras de cacao y el control (*C. musae* en solitario)..... 36

Figura 21. Enfrentamiento *C. musae* contra bacterias fermentadas de cacao (A) *Lactiplantibacillus plantarum* vista desde la parte superior de la placa, (B) *Lactiplantibacillus plantarum* vista desde la parte inferior, (C) *Bacillus* sp. , (D) *Bacillus* sp. vista desde la parte inferior, (E) *Lactiplantibacillus fabifermentans* vista desde la parte superior de la placa, (F) *Lactiplantibacillus fabifermentans* vista desde la parte inferior .Se observa una zona clara de inhibición del fitopatógeno en presencia de las bacterias

antagonistas.	36
Figura 22. Gráfico de barras del diámetro del patógeno <i>C. musae</i> contra <i>T. inhamatum</i> y control a lo largo del tiempo (Día 1 a Día 4).	38
Figura 23. (A) Colonización de <i>T. inhamatum</i> contra <i>C. musae</i> , (B) Control <i>C. musae</i> durante el cuarto día de evaluación.	38
Figura 24. Ausencia de interacción observable entre Sigatoka negra y cepas antárticas en diferentes configuraciones en sentido de las manecillas del reloj, comenzando desde la posición superior (A) <i>Pseudomonas fluorescen</i> , <i>Pseudomonas paraversuta</i> , <i>Janthinobacterium</i> sp., <i>Filibacter</i> sp., (B) <i>Arthobacter livingstonensis</i> , <i>Rhodoccus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas kitaguniensis</i> (C) <i>Pseudomonas numensis</i> , <i>Janthinobacterium tractae</i> , <i>Pseudomonas silesiensis</i> , <i>Chryseobacterium</i> sp.	40
Figura 25. Ausencia de inhibición observable entre Sigatoka negra y bacterias obtenidas de la fermentación de cacao en diferentes configuraciones en sentido de las manecillas del reloj, comenzando desde la posición superior (A) <i>Acetobacter ghanensis</i> , <i>Acetobacter papayae</i> , <i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>Bacillus altitudinis</i> , (B) <i>Paenibacillus vulneris</i> , <i>Paenibacillus acanthi</i> , <i>Liquoribacillus mali</i> , <i>Brevibacillus formous</i> , (C) <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Levilactobacillus brevis</i> , <i>Acetobacter</i> sp., <i>Bacillus velezensis</i> (D) <i>Bacillus paramycoides</i> , <i>Acetobacter tropicalis</i> , <i>Staphylococcus capitis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> .42	
Figura 26. Interacción in vitro entre <i>P. fijiensis</i> y hongos filamentosos del género <i>Trichoderma</i> y <i>Absidia</i> en el cuarto día de evaluación	44
Figura 27. Gráfico de barras del diámetro del patógeno <i>P. fijiensis</i> en presencia de hongos antagonistas y su diámetro en el control.	44

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 Introducción

La exportación de banano (*Musa spp.*) es una de las principales fuentes de ingreso económico para Ecuador, convirtiendo al país en uno de los líderes en la exportación de esta fruta. De acuerdo con datos registrados por el Banco Central del Ecuador (BCE), tan solo en el primer trimestre del 2023 hubo un valor exportado equivalente a USD 1.055,4 millones, convirtiendo al banano en un pilar económico para el país (Ilich Aguirre S et al., 2024). Sin embargo, las exportaciones de banano se ven severamente afectadas año a año por la presencia de plagas. En Ecuador, los cultivos de banano se ven afectados por enfermedades como el Moko causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum*, o enfermedades de origen fúngico como la Antracnosis y la Sigatoka negra causada por *Colletotrichum musae* y *Pseudocercospora fijiensis*.

De acuerdo con el Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca, el banano orgánico ecuatoriano se posiciona como el principal producto exportado hacia mercados significativos, incluyendo la Unión Europea. Según el BCE, este producto representó el 51,3% del total de exportaciones en su categoría durante el 2023. En este sentido, la presencia de plagas que ocasionan pérdidas totales del cultivo o reducen su calidad afecta de forma directa la cantidad de banano apto para ser exportado a mercados internacionales (Ilich Aguirre S et al., 2024.; Ministerio de Producción, 2024).

Dentro de los desafíos intrínsecos en la erradicación de patógenos se encuentra un nuevo factor, la preferencia a productos orgánicos y libres de químicos. Esto gracias al creciente interés en la población sobre inocuidad alimentaria, lo que ha generado una percepción negativa sobre uso de agroquímicos (Wolf et al., 2020). Se ha demostrado que su uso indebido es causante de daños al medio ambiente y salud de los humanos, motivo por el cual la industria agrícola se ha visto impulsada a buscar alternativas para estos (The Food Tech, 2024).

Por varias décadas la comunidad científica ha explorado el uso de microorganismos como agentes de control frente a fitopatógenos, entre estos, bacterias y hongos que se encuentran en todo tipo de entorno. Los microorganismos catalogados como agentes de

biocontrol poseen propiedades antagonistas, principalmente inhibiendo la acción patógena de otro agente en los cultivos a nivel global (Ayaz et al., 2023).

En base a lo expuesto, la presente investigación busca identificar especies de microorganismos que funcionen como una alternativa de biocontrol y estrategias de manejo fitosanitario en cultivos de importancia económica. Asegurando sostenibilidad con el medio ambiente y alta productividad para el sector agropecuario obtenidas a partir de la fermentación del cacao, suelo antártico y de zonas protegidas como el Bosque protector Prosperina frente a los fitopatógenos causantes del Moko, Antracnosis y la Sigatoka negra, (Churchill, 2011; Ochoa-Jiménez et al., 2024; Ramos-Veintimilla et al., 2024).

1.2 Planteamiento del problema

Tradicionalmente, las prácticas de manejo intensivo asociado a plagas en cultivos de banano se han basado en la aplicación directa de insumos químicos. Estos últimos han generado un alto impacto antrópico, tales como la contaminación de suelos y la inducción de mecanismos de resistencia en los patógenos, lo que representa una desventaja para su control (Regalado et al., 2019).

Frente a esta problemática, la industria agrícola busca implementar alternativas de control óptimas y sostenibles brindando como estrategia principal la aplicación de bioinsumos. Se definen como compuestos derivados de microorganismos vivos capaces de mejorar el rendimiento, sanidad y seguridad de un cultivo (Mamani & Filippone, 2019). Los bioinsumos presentan diferentes mecanismos, como el crecimiento, diferenciación y desarrollo vegetal, solubilización de nutrientes vitales, liberación de metabolitos secundarios que estimulan a la defensa de las células vegetales frente a fitopatógenos (Pedraza et al., 2021).

En este sentido, explorar fuentes de microorganismos provenientes de diversos entornos, como zonas protegidas, ecosistemas psicrófilos o procesos de biotransformación, se posicionan como una alternativa prometedora para el control de patógenos que se manifiestan en la poscosecha (Zapata et al., 2018). Estudios reportan géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Trichoderma* como agentes clave para el biocontrol, capaces de enriquecer el entorno enzimático y nutricional de la especie vegetal tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* (Vera, 2018). La riqueza en biodiversidad y condiciones climáticas únicas de nuestro país favorecen el desarrollo de microorganismos nativos con un alto potencial como herramientas

biotecnológicas para la agricultura, contribuyendo a una producción agrícola local más eficiente (Viera-Arroyo et al., 2020).

1.3 Justificación

La incorporación de microorganismos promisorios en las prácticas agrícolas contribuye a la seguridad alimentaria y del consumidor (Moreno, 2016). Además, impulsa la investigación acerca de las interacciones microbiológicas que se manifiestan a nivel *in vitro* como *in situ*, facilitando un conocimiento más profundo de su papel en el agroecosistema (Cruz et al., 2021).

Las bacterias que participan en la fermentación de semillas de cacao producen compuestos antifúngicos como el ácido fenilacético (PLA) y etanol o péptidos de bajo peso molecular, esenciales en la interrupción de funciones celulares vitales para la supervivencia del patógeno en el huésped (Ruggirello et al., 2019). La Antártida alberga microorganismos con adaptaciones únicas, capaces de generar enzimas de interés biotecnológico como la quitinasa, que ha reportado actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos como *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* (Liu et al., 2019).

Los hongos aislados del Bosque protector Prosperina comprenden diversos géneros como *Trichoderma*, *Talaromyces*, *Cladosporium* (Carreño et al., 2023) los cuales se especializan por secretar metabolitos con propiedades específicas. Por ejemplo, el género *Talaromyces* produce la gliotoxina y el ácido cítrico, que reportan actividad antimicrobiana. El género *Cladosporium* produce policétidos como el cladosporol A, un metabolito secundario asociado a la inhibición directa en presencia de patógenos (Espejo, 2022).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad inhibitoria de microorganismos benéficos para el biocontrol de enfermedades en el cultivo de banano (*Musa* spp.).

1.4.2 Objetivos específicos

Realizar ensayos de confrontación directa en placa Petri para identificar cepas con posible acción antagonista para el control de patógenos en banano causantes de Sigatoka negra, Moko y Antracnosis del banano.

Determinar el efecto inhibitorio de las cepas promisorias provenientes de suelos antárticos, fermentados de cacao y hongos benéficos del Bosque Protector Prosperina para el control de los patógenos *Ralstonia solanacearum*, *Pseudocercospora fijiensis* y *Colletotrichum musae*.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1 Cultivo de banano (*Musa* spp.)

El banano (*Musa* spp.) es una hierba perenne monocotiledónea gigante, pertenece a la familia Musaceae y al orden Zingiberales. Su origen se da en zonas con clima tropical húmedo como el sudeste asiático, pero es distribuida en la gran mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Israeli & Lahav, 2016). Dentro de la familia Musaceae además del género musae se encuentra el *Ensete*, originario de África tropical y Asia del sur. De forma más específica podemos decir que el banano se originó en las selvas húmedas de Melanesia y las regiones monzónicas a partir del sur de China hasta el noreste de la India (Israeli & Lahav, 2016; Omar Andrés Velez Chang et al., 2024).

Debido a la dificultad de distinción entre variedades silvestres y comestibles diploides o poliploides la taxonomía de *Musa* se encuentra en constante cambio, su clasificación se determina según la cantidad de cromosomas presentes dando lugar a cuatro secciones; Eumusa, actualmente *Musa* y *Rhodochlamys*, que cuentan con 11 pares de cromosomas, y Callimusa y Australimusa con 10 pares, factores para su clasificación dentro de las cuatro secciones, es su color y morfología de su semilla (Israeli & Lahav, 2016). En la sección Eumusa se encuentran variedades triploides productos del cruce que se da entre *Musa acuminata* (AA) y *Musa balbisiana* (BB), este cruce resulta en la creación de los musáceos comestibles más reconocidos como, AAA Cavendish, Gros Michel AAB, Curraré y Dominico ABB (Velez, 2021).

2.2 Distribución global

El banano se ha esparcido a nivel global en regiones tropicales y subtropicales como lo son el sur de Asia, que cuenta con una gran variedad de especies de *Musa*, entre las más populares *M. balbisiana*, *M. itinerans*, *M. acuminata*, and *M. yunnanensis* (Jenny et al., 2024). En los estados del noreste de India es donde se encuentra la mayor diversidad, 30 taxones de los cuales 19 son endémicos (Sabu et al., 2016). *Musa* además es cultivada en África, donde la población depende de este fruto para su alimentación, y en Latinoamérica donde se cultivan mayormente híbridos para su comercialización. La producción anual de *Musa* ronda los 145 millones de toneladas, de las cuales el 85% proviene de pequeños productores en países en desarrollo (Burgos-Hernández et al., 2017; Ortiz & Swennen, 2014).

2.3 Importancia económica

En alrededor de 120 países el banano es cultivado como un alimento esencial, su siembra se encuentra principalmente en América Latina, Asia, África y las Islas del Pacífico. destinadas para el consumo local. Sin embargo, la región latinoamericana se enfoca más en el comercio internacional (Israeli & Lahav, 2016). El banano se posiciona como la fruta de mayor exportación, su valor y volumen destacan en el comercio internacional, originario de países como Ecuador, Costa Rica y Filipinas considerándolos líderes en la exportación de esta fruta. Ecuador aporta el 27% de la oferta global como comerciantes, generando millones de empleos a comunidades rurales y estableciéndose como un pilar fundamental para la economía de muchos países (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2024).

2.4 Morfología y ciclo de vida

El banano se encuentra bajo la clasificación de plantas herbáceas monocárpicas gigantes, cuentan con un rizoma subterráneo que produce brotes o también conocidos como chupones para formar nuevas plantas. Cuentan con un pseudotallo conformado por vainas florales apretadas, hojas con pecíolos robustos e inflorescencia terminal que surge al finalizar el ciclo de vida como se observa en la **figura 1** (Israeli & Lahav, 2016).



Figura 1. Morfología de la planta de banano *Musa* spp. (A) Lámina, (B) Racimo, (C) Inflorescencia, (D) Pseudotallo, (E) Hijuelo, (F) Raíces y rizoma y (G) Pecíolo.

Las raíces adventicias pueden alcanzar entre 60 cm a 80 cm de profundidad y se pueden extender en dirección horizontal de tres a cinco metros. El desarrollo del banano se encuentra dividido en 3 etapas vegetativa, reproductiva y de fructificación. La planta del banano cuenta con flores femeninas en las manos proximales de la espiga, seguidas de flores neutras y masculinas. La fructificación partenocárpica ocurre por producción autónoma de auxina en el ovario. El crecimiento del banano inicia con el crecimiento de la cáscara, posterior a esto se produce la pulpa, el peso del racimo dependerá del número de manos, dedos y del tamaño del racimo en sí. La cosecha del banano se realiza en la semana 9 o 10 cuando la fruta aún se encuentra verde. Para su comercialización se suelen emplear métodos como el control de temperatura, mantener el fruto a alta humedad y reducir el etileno para ralentizar el proceso de maduración (Israeli & Lahav, 2016).

2.5 Principales fitopatógenos que afectan al cultivo de banano

2.5.1 *Ralstonia solanacearum*

Bacteria Gram- negativa perteneciente a la clase *Proteobacteria* dentro de la familia *Ralstoniaceae*. A nivel morfológico se presentan como colonias fluidas (mucoideas) virulentas de coloración blanca y no fluidas de color rosa menos virulentas (Zaquicela et al., 2025). Esta característica está asociada a la producción de exopolisacárido, los cuales desempeñan un papel clave en su virulencia y rol biológico.

Los síntomas asociados a la infección son marchitamiento, pigmentación amarilla anormal (epinastia), malformación en follaje y formación de raíces adventicias. A nivel interno, se observa una decoloración gradual del tejido vascular, específicamente en la xilema, hasta alcanzar necrosis completa. La bacteria ingresa al huésped a través de sus raíces o heridas, desplazándose hacia el sistema vascular interfiriendo en el transporte de agua y nutrientes (Biosca et al., 2010).

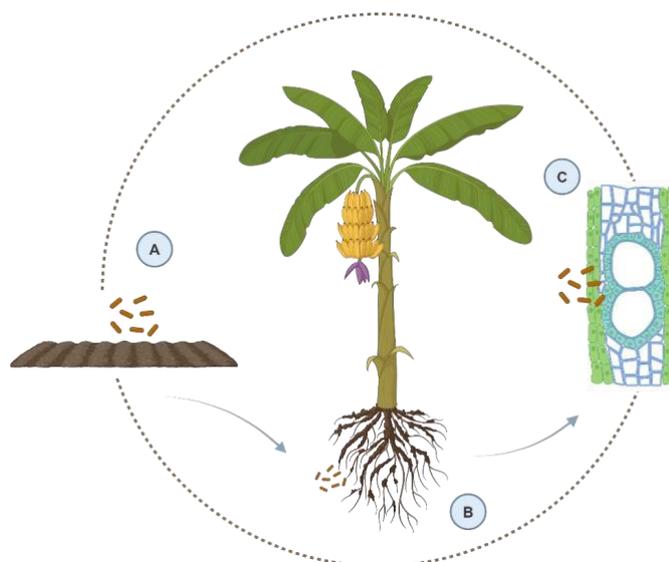


Figura 2. Ciclo de vida de *Ralstonia solanacearum* (A) Bacteria patógena situada en suelo, (B) Fijación y penetración a través de raíces y aberturas naturales, (C) Colonización del tejido xilema causando obstrucción y desencadenando marchitez progresiva.

2.5.2 *Pseudocercospora fijiensis*

El agente causal de la Sigatoka negra, considerada la enfermedad más agresiva del banano. Es un hongo ascomiceto de la clase Dothideomycetes cuya reproducción se puede manifestar de forma sexual (*Mycosphaerella fijiensis*) y asexual (*Pseudocercospora fijiensis*). Sexual por medio de ascosporas producidas en estructuras llamadas pseudotecios, que facilitan su propagación a largas distancias y se manifiestan principalmente en lesiones maduras, en cambio, asexual por medio de conidios asociados a su dispersión en distancias cortas (Orozco, 2024).

Los síntomas asociados a su infección derivan en estrías necróticas de color rojizo a marrón, pérdida de capacidad fotosintética, maduración prematura en sus frutos y bajo rendimiento en la calidad del cultivo. Al tener un ciclo de vida corto en su forma sexual deriva en una alta tasa de variabilidad genética por cada generación (Noar et al., 2022; MaridueñaZavala et al., 2024).

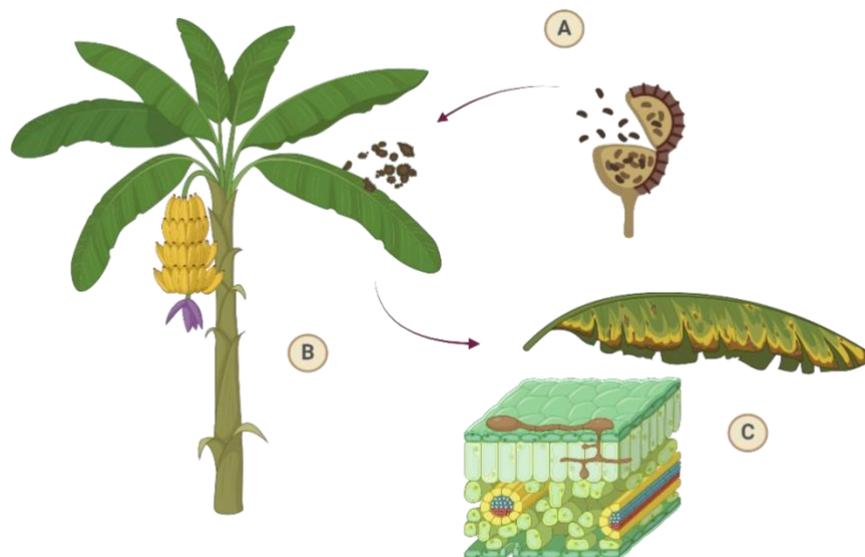


Figura 3. Ciclo infeccioso de *Pseudocercospora fijiensis*. (A) Diseminación de ascosporas por medio del viento. (B) Infección y desarrollo en planta hospedera. (C) Colonización interna en célula vegetal que producirá estrías necróticas en hojas.

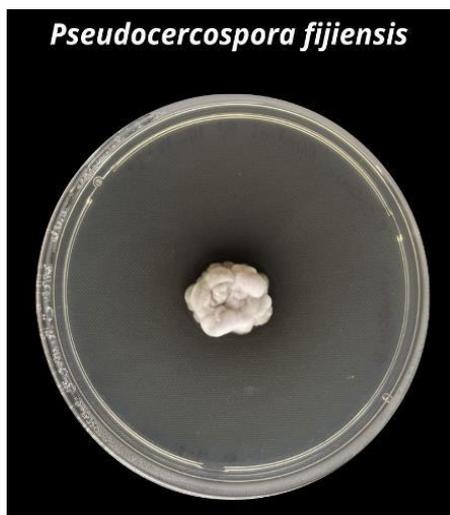


Figura 4. *Pseudocercospora fijiensis* en medio de cultivo. Se observa micelio de textura algodonosa color rosa después de 3 semanas de incubación a 28°C en medio PDA.

2.5.3 *Colletotrichum musae*

Hongo ascomiceto de la familia Glomerellaceae, cuya reproducción ocurre solo de forma asexual mediante conidióforos albergado en acérvulos dentro del tejido de su hospedero (raquis, pseudopecíolos y hojas). A nivel *in vitro* se observa un crecimiento de forma radial uniforme y la formación de micelio de textura algodonosa en su fase aérea, con tonalidades que

varían del pardo al naranja **figura 5**. La temperatura óptima para su desarrollo oscila entre los 27°C y 30°C, a un intervalo de pH entre 4 y 5,5. Sus síntomas se manifiestan como lesiones necróticas en los tejidos del fruto, las cuales incrementan de tamaño a medida que avanza su estado de maduración. Ocurre en la etapa de postcosecha, durante el almacenamiento, transporte y comercialización del banano resultando en altas pérdidas económicas y rechazo en el mercado. Cabe destacar que la lluvia actúa como el principal vector de propagación de la enfermedad, favoreciendo su diseminación (Mejía, 2022).



Figura 5. *Colletotrichum musae*. Micelio de apariencia algodonosa color naranja después de 4 días de incubación a 28°C en medio PDA.

2.6 Control biológico mediado por microorganismos

El antagonismo microbiano hace referencia a las interacciones entre microorganismos en las que uno de ellos se ve afectado por acción de otro, provocando su deterioro o muerte (Pérez et al., 2014). El empleo de microorganismos como agentes de biocontrol constituye un enfoque innovador y sostenible dentro del manejo de plagas que afectan cultivos de importancia económica, que prometen un alto potencial para transformar las prácticas agrícolas convencionales.

Se han reportado cepas con actividad biocontroladora que implementan mecanismos frente a patógenos que incluyen la biosíntesis de metabolitos secundarios con actividad citotóxica, la inducción de respuestas de defensa sistémica en las plantas, y la competencia por

nutrientes esenciales y espacio (Moreno et al., 2018). De este modo contribuyen al equilibrio de la comunidad microbiana del suelo y de la biosfera sin incidencias de compuestos químicos sintéticos (Moreno et al., 2018). Algunos de los principales microorganismos identificados y promovidos en formulaciones como bioinsumos para el control de patógenos se detallan a continuación.

2.6.1 Hongos del género *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. ha sido utilizado en formulaciones comerciales, posicionándose como una alternativa biotecnológica esencial con una participación superior al 50% en el mercado global de biofungicidas (Conrado Meyer et al., 2022). Dentro de las especies más aplicadas se encuentran *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma stromaticum* cuya actividad antifúngica ha sido reportada para el manejo de patógenos en cultivos de soja y tomate.

Este género sobresale como el principal antagonista en el enfrentamiento contra fitopatógenos gracias a su habilidad reflejada en la competencia eficiente por nutrientes esenciales, la producción de metabolitos bioactivos específicos asociados a antibióticos y enzimas hidrolíticas (antibiosis), y el micoparasitismo, un proceso en el que el hongo se enfrenta directamente al patógeno en distintas etapas de su desarrollo, finalizando con su colonización (Campanioni et al., 2019). La aplicación de *Trichoderma* no solo potencia la salud de las plantas y la productividad de las cosechas, sino que también promueve la preservación ecológica y el equilibrio de los agroecosistemas, proporcionando una respuesta sostenible y efectiva ante los retos agrícolas actuales. Además, existen investigaciones que reportan su capacidad biorremediadora, siendo capaces de descomponer compuestos orgánicos y contaminantes persistentes del ambiente fijados en el suelo (Rojas, 2024).

2.6.2 Bacterias del género *Bacillus* spp. y *Pseudomona* spp.

Estas bacterias constituyen un componente esencial de la microbiota del suelo y la rizósfera, funcionando como promotores del crecimiento vegetal y como mecanismos de biocontrol de fitopatógenos (Gaviria, 2023). Dentro de sus mecanismos fundamentales presentan la producción de metabolitos secundarios.

El género *Bacillus* produce sustancias como surfactinas, fengicinas e iturinas, que son efectivos antifúngicos. Por otro lado, el género *Pseudomonas* induce la producción de sideróforos y compuestos orgánicos volátiles (VOCs) capaces de frenar el desarrollo de agentes patógenos. Ambos géneros muestran conductas parasíticas a través de la liberación de enzimas hidrolíticas como quitinasas y glucanasas, que desintegran las paredes celulares de los fitopatógenos. Especies bacterianas como *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* han probado su efectividad frente a hongos fitopatógenos como *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinérea* manifestados en una amplia gama de cultivos (Ali et al., 2022).

2.6.3 Bacterias aisladas de la fermentación del cacao: diversidad y potencial bioactivo

Las bacterias que participan en la fermentación del cacao son microorganismos esenciales en el proceso de convertir las semillas de cacao en un producto con las propiedades organolépticas características del chocolate. Trabajan de la mano con las levaduras en diferentes etapas de la fermentación, sintetizando diferentes compuestos a través de rutas metabólicas que darán lugar al producto final (Essia Ngang et al., 2015; Ruggirello et al., 2019).

Se clasifican principalmente en bacterias de ácido láctico (BAL) y bacterias de ácido acético (BAA). Las BAL, como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*, participa en la etapa inicial de fermentación acidificando el medio gracias a la conversión de los azúcares esenciales hallados en la pulpa. Han sido reconocidas por sus propiedades antifúngicas y actividad metabólica de compuestos bioactivos como bacteriocinas, exopolisacaridos y fenil láctico (Peralta et al., 2021).

Por otro lado, las BAA, como *Acetobacter* spp. y *Gluconobacter* spp., actúan en las etapas finales oxidando el etanol producido por las levaduras para generar ácido acético, un compuesto clave en el control de microorganismos fitopatógenos además de la síntesis de polihidroxicanoatos, actuando como agentes protectores a la planta huésped (Ruggirello et al., 2019).

2.6.4 Microorganismos antárticos

Las bacterias de origen antártico son microorganismos que han encontrado formas de sobrevivir en las condiciones extremas presentes en el continente antártico como bajas temperaturas, alta radiación ultravioleta, ciclos de congelación y descongelación, desecación, falta de nutrientes y fuertes vientos (Ramasamy et al., 2023). Estas bacterias son fundamentales para los ecosistemas polares y desempeñan un papel vital en el ciclo biogeoquímico para adaptarse, han desarrollado varias estrategias, como modificar sus membranas celulares, producir proteínas de choque frío y anticongelante, acumular solutos compatibles y generar enzimas que funcionan a bajas temperaturas (Jorge et al., 2019). Además, han desarrollado mecanismos para sobrevivir en las duras condiciones del continente, estos mecanismos incluyen adaptación a bajas temperaturas, producción de pigmentos e incluso generación de compuestos antimicrobianos y biosíntesis de nanopartículas (Silva et al., 2018).

Al necesitar competir por recursos y sobrevivir en el ambiente hostil, algunas bacterias antárticas producen compuestos antimicrobianos. Yong (2024) encontró 25 cepas de bacterias antárticas con efecto inhibitor sobre una o más bacterias patógenas de prueba. Este efecto inhibitor se lo atribuyó a compuestos bioactivos generados por las bacterias al ser enfrentadas, estos compuestos incluyen moléculas como péptidos antimicrobianos, metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas, estos son los responsables de inhibir el crecimiento de patógenos, por lo que tienen el potencial de ser utilizados como alternativas a los antibióticos convencionales (Yong et al., 2024).

2.7 Medios de cultivo

2.7.1 Medio casamino acid peptone glucose (CPG)

Medio selectivo empleado para el aislamiento e identificación de la bacteria patógena *Ralstonia solanacearum*. Su composición nutricional incluye glutamato y citocromos esencial para su metabolismo. Además, si se emplea este medio sus colonias virulentas se manifiestan con una coloración blanca a crema, fluidas de forma irregular, pero varían dependiendo del medio utilizado (García et al., 2019).

2.7.2 Medio trypticase soy agar (TSA)

Medio no selectivo empleado para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos no exigentes (bacterias y hongos). Su composición nutricional posee péptidos, vitaminas, hidratos de carbono además del agente solidificante agar-agar derivado de algas marinas (Zepeda, 2015).

2.7.3 Medio potato dextrose agar (PDA)

Medio no selectivo para el aislamiento de hongos filamentosos incluyendo de tipo patógeno y levaduras. Su composición nutricional se basa en carbohidratos, vitaminas y azúcares. Además, este puede ser suplementado con antibióticos para inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados. Este medio de cultivo se usa para monitorear la respuesta metabólica bajo diferentes condiciones experimentales (Rodríguez et al., 2017).

2.8 Prueba de enfrentamiento dual

Es una técnica experimental que consiste en inocular de forma simultánea un microorganismo fitopatógeno y un antagonista dentro de la misma placa en condiciones *in vitro*, distanciados a una medida específica para observar su interacción directa. El objetivo principal es evaluar el efecto inhibitorio del antagonista sobre el patógeno, ya sea mediante competencia por sustrato, producción de metabolitos inhibitorios (antibiosis) o interacción física (micoparasitismo). Como ventaja principal permite establecer una preselección de microorganismos benéficos previo aplicación *in situ* (Martínez et al., 2014).

Capítulo 3

Materiales y Métodos

El presente trabajo de titulación forma parte del proyecto externo denominado **CIBE600-2018: “Establecimiento, Conservación y Preservación de una Colección de Cultivos Microbianos del Ecuador con fines de investigación”**. La metodología empleada se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la escuela superior politécnica del Litoral (ESPOL) en el laboratorio de Bioseguridad nivel 2 (BSL-2) (Maridueña et al., 2021).

3.1 Tipo de diseño: Exploratorio

Un diseño experimental de tipo exploratorio se enfoca en analizar, explorar un tema poco estudiado o del que no existe información suficiente de manera cualitativa. Busca identificar variables relevantes y recopilar información base para futuros estudios. No tiene como objetivo final presentar conclusiones de manera objetiva, sino más bien generar hipótesis o guías para investigaciones posteriores más profundas (Mousalli-Kayat, 2015). Este diseño se aplicará para explorar las interacciones entre microorganismos benéficos y patógenos asociados al cultivo de banano, con énfasis en identificar cepas como estrategias de biocontrol para experimentos futuros.

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos benéficos según su fuente y número de cepas.

Microorganismos y fuentes	Total (número de cepas)
Bacterias extraídas del suelo antártico	25
Hongos provenientes del Bosque Protector Prosperina	6
Bacterias provenientes de la fermentación del cacao	30

Tabla 2. Nombre científico de los patógenos de banano estudiados y el nombre común de la enfermedad que producen.

Patógenos	Nombre Común de la enfermedad
-----------	-------------------------------

<i>Ralstonia solanacearum</i>	Moko
<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	Sigatoka Negra
<i>Colletotrichum musae</i>	Antracnosis

Se realizará un ensayo preliminar con enfrentamientos múltiples para los patógenos: *Ralstonia solanacearum* y *Colletotrichum musae* contra las cepas promisorias benéficas con el fin de seleccionar los microorganismos con mejor desempeño inhibitorio frente al patógeno para su evaluación final de carácter individual. En el caso del patógeno *Pseudocercospora fijiensis*, debido a sus prolongados tiempos de crecimiento, se realizará un único enfrentamiento de tipo múltiple para evaluar la actividad inhibitoria. Cada ensayo final se realizará por triplicado, garantizando la reproducibilidad de los resultados.

3.2 Reactivación de microorganismos

3.2.1 Condiciones de siembra de microorganismos

Bacterias extraídas de la fermentación del cacao

Para realizar la siembra de las bacterias extraídas de la fermentación del cacao se empleará Agar Trypticase Soya (TSA) y para su incubación se mantendrán a 28°C por un periodo de tiempo de 24 horas.

Bacterias antárticas

Se utilizó medio TSA para la siembra de bacterias provenientes de suelos antárticos, se incubarán a una temperatura de 4°C por un periodo de incubación de 72 horas.

Bacteria patógena Ralstonia solanacearum

Para el cultivo de la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* se empleó el medio Caseína-Peptona-Glucosa agar (CPG) y serán incubadas durante 48 horas a una temperatura de 28°C.

Hongos promisorios del Bosque Protector Prosperina y hongos patógenos

Los hongos por emplear durante los ensayos serán sembrados en Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubarán a 28°C por un periodo de 7 días.

3.2.2 Proceso de reactivación de bacterias y hongos

Los microorganismos de la colección de cultivos microbianos seleccionadas se encontraban conservadas mediante la técnica de ultracongelación a -80 °C en crioviales que contenían caldo yeast extract peptone dextrose (YPD) para hongos y caldo Luria-Bertani (LB) para bacterias, ambos suplementados con glicerol al 20 %, para garantizar su viabilidad. Bajo la metodología de Rocha et al. (2019) se llevó a cabo la reactivación de cada cepa en condiciones estériles. Cada microorganismo fue sembrado bajo las condiciones estipuladas según sus características (**figura 6**).

Tras obtener crecimiento del microorganismo en placa Petri, se inoculó el microorganismo en 15 ml de caldo Luria-Bertani (LB) en tubos Falcon de 50 ml autoclavados. Se aplicaron las mismas condiciones de temperatura y tiempo de incubación previamente descritos para cada cepa.



Figura 6. Proceso general de reactivación de microorganismos (1) Extracción de microorganismos crioconservado a -80°C . (2) Toma de muestra con asa de siembra estéril. (3) Siembra por estriado en medio de cultivo. (4) Incubación en condiciones óptimas.

3.3 Metodologías para los enfrentamientos antagónicos preliminares y finales

3.3.1 Enfrentamientos preliminares *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum vs bacterias

Siguiendo el protocolo de Imanbayeva (2024) para el enfrentamiento de la bacteria patógena *R. solanacearum* frente a las bacterias benéficas, se empleó la siguiente metodología. En primer lugar, se sembró la bacteria patógena en toda la caja Petri utilizando un hisopo. Luego, se realizaron cuatro huecos con el sacabocado en cuatro puntos de los extremos de las cajas, donde se colocó 50 μl del inóculo de cada cepa bacteriana benéfica.

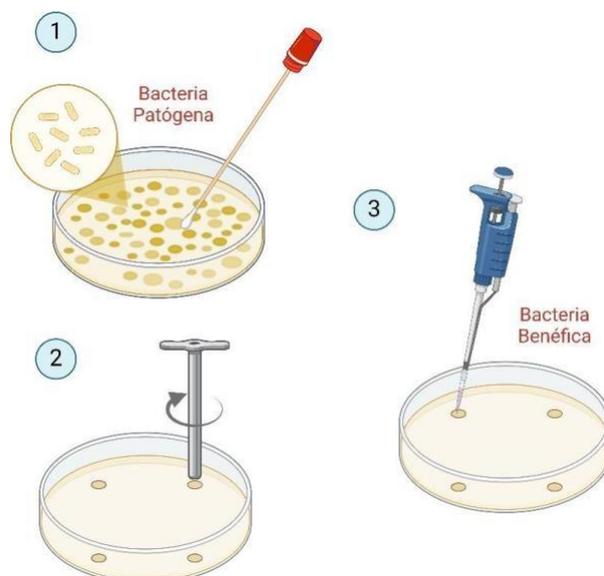


Figura 7. Evaluación preliminar entre *R. solanacearum* frente a bacterias benéficas (1) Siembra por estriado de bacteria patógena, (2) Preparación de los pocillos, (3) Inoculación de la cepa benéfica.

***R. solanacearum* vs hongos**

Tomando como referencia la metodología propuesta por Nysanth et al. (2022) se llevó a cabo la siguiente metodología para la evaluación de la bacteria patógena frente a los hongos benéficos. Se realizó enfrentamientos duales. Para ello, se inoculó una línea central de 4 cm de longitud de *R. solanacearum*. Seguido, se colocará un disco de micelio de cada hongo a una distancia de 1.5 cm del borde de la placa de manera centrada frente al patógeno.

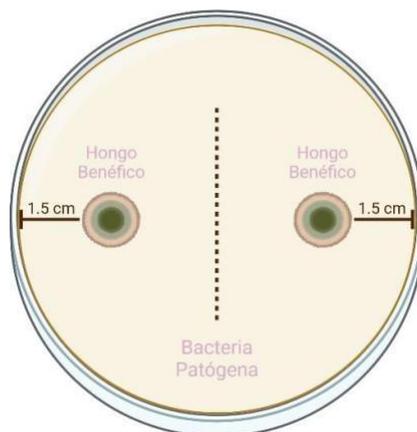


Figura 8. Ubicación de microorganismos para el enfrentamiento preliminar de *R. solanacearum* contra hongos benéficos.

3.3.2 Enfrentamientos finales de *Ralstonia solanacearum*

Se seleccionarán los microorganismos benéficos que demuestren un mejor halo de inhibición en el ensayo preliminar para realizar enfrentamientos individuales frente al patógeno siguiendo las metodologías mencionadas.

3.3.3 Enfrentamientos preliminares *Colletotrichum musae*

***C. musae* vs bacterias**

Siguiendo la metodología de Nysanth et al. (2022) en esta evaluación, se inocula un disco de agar del patógeno en el centro de la placa Petri empleando un sacabocados, mientras que las bacterias benéficas se siembran trazando una línea paralela a 1.5 cm de distancia de cada lado del hongo como se observa en la **figura 9**.

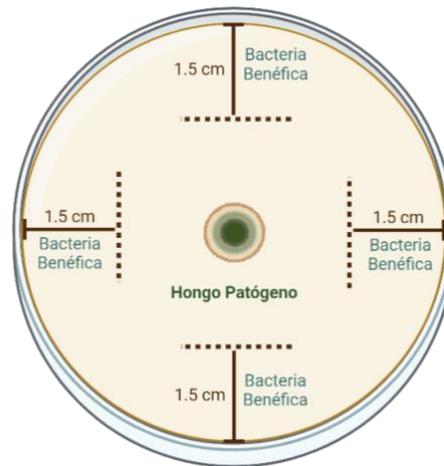


Figura 9. Ubicación de los microorganismos para evaluación del hongo patógeno y bacterias benéficas.

***C. musae* vs hongos**

La metodología fue modificada según el protocolo descrito por Nysanth et al. (2022). Durante la evaluación de *C. musae* frente al agente benéfico, el hongo patógeno se sembró en el centro de la placa Petri, mientras que la cepa benéfica se inoculará en el extremo opuesto manteniendo una distancia de 1 cm.

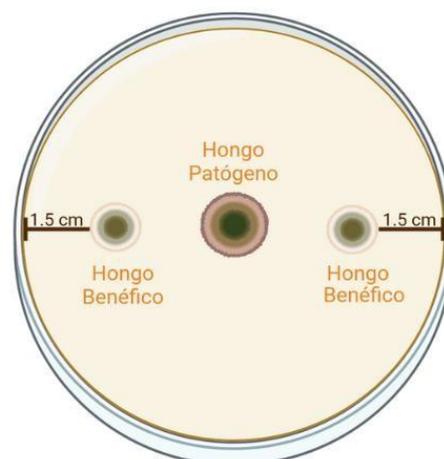


Figura 10. Ubicación de los microorganismos para la evaluación preliminar del hongo *C. musae*, contra los hongos benéficos.

3.3.4 Enfrentamientos de *Pseudocercospora fijiensis*

Entre una de las principales características morfológicas más destacadas de *P. fijiensis* (conocida de manera imperfecta como *Mycosphaerella fijiensis*) incluye un crecimiento tardío, además el crecimiento del micelio se produce de manera compacta e irregular (no radial) en condiciones *in vitro* (Rodríguez García et al., 2005). Por lo tanto, se sembraron trozos del hongo de 0.8 mm de diámetro en el centro de placas Petri utilizando el medio PDA, permitiendo su crecimiento óptimo tres semanas antes previo al ensayo final.

P. fijiensis vs bacterias

Siguiendo la metodología modificada descrita por Nysanth et al. (2022) a partir del eje central de la placa Petri con el patógeno sembrado, se midieron cuatro líneas radiales hacia el exterior, a una distancia de 1.5 cm (**figura 11**). Sobre estas líneas, se sembró cada cepa benéfica. Dicho ensayo fue realizado por triplicado.

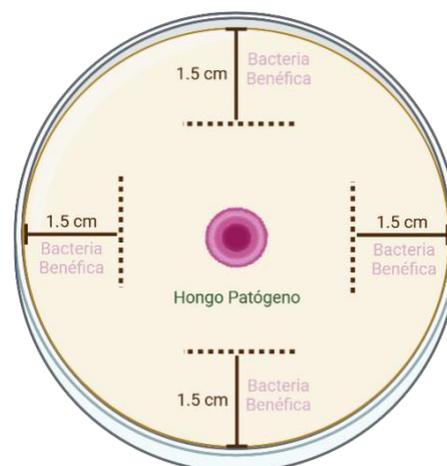


Figura 11. Esquema del enfrentamiento de *P. fijiensis* contra bacterias benéficas.

P. fijiensis vs hongos

En este enfrentamiento se seguirá la metodología modificada de Nysanth et al. (2022) que sugiere sembrar al patógeno en un extremo de la placa a una distancia de 1.5 cm. Seguido, se inocular un disco de micelio activo de cepa benéfica tomando la misma distancia hacia el exterior, como se observa en la **figura 12**.

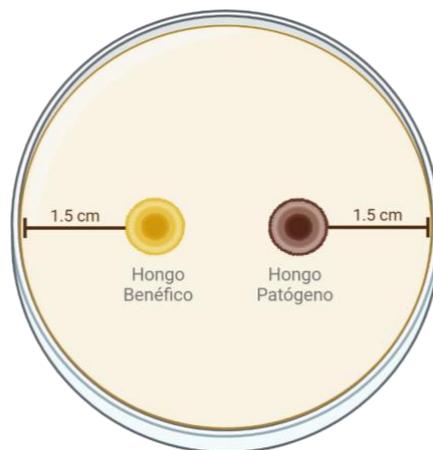


Figura 12. Esquema del enfrentamiento de *P. fijiensis* contra hongos filamentosos.

3.4 Criterios de selección preliminar

La selección de cepas bacterianas y fúngicas se evaluarán bajo criterios cualitativos y de observación directa, en placa Petri donde se refleje efecto antagonista o inhibitorio por parte del microorganismo promisorio a partir de las 48 horas. Un ejemplo de este tipo de ensayo es el realizado por Cesa et al. (2020) quien reporta halos de inhibición simultáneos por parte de bacterias productoras de compuestos antimicrobianos como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Burkholderia* frente a fitopatógenos asociado a distintos cultivos como *R. solanacearum* y *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* agente causal de la gomosis en la caña de azúcar.

3.5 Registro de datos

A partir de cada enfrentamiento final se llevarán tratamientos y controles por triplicado registrando los siguientes parámetros durante un periodo de 7 días:

- Para *Ralstonia solanacearum* contra bacterias mediremos el diámetro del halo de inhibición en milímetros (mm) cuando esté presente empleando una regla y para su enfrentamiento contra hongos se medirá el diámetro del hongo y la distancia desde el borde micelial hasta la colonia bacteriana estriada de forma vertical.
- Para *Colletotrichum musae* contra bacterias mediremos el diámetro del fitopatógeno (mm) y la distancia desde el borde micelial hasta la colonia bacteriana seleccionada. En el enfrentamiento hongo-hongo se medirá el diámetro de crecimiento micelial de forma horizontal de cada uno.

- En el caso de *Pseudocercospora fijiensis*, se realizará un único ensayo por triplicado basado en los mismos criterios que el patógeno *C. musae* tanto para bacterias antárticas, fermentados de cacao y hongos del Bosque protector.

3.6 Análisis estadístico

Para el análisis preciso de los datos registrados durante el ensayo se realizarán pruebas que se ajusten a la dispersión de los datos y según las combinaciones de las metodologías empleadas (bacteria - bacteria), (bacteria - hongo) y (hongo - hongo).

- Para el enfrentamiento del fitopatógeno *R. solanacearum* contra bacterias proveniente de la fermentación de cacao se aplicará la prueba t pareada para estimar los valores de las cepas que presenten un mejor grado de significancia, considerando el valor de $p < 0.05$ en base a sus días de enfrentamiento.
- Para el enfrentamiento *C. musae* enfrentadas contra bacterias proveniente de la fermentación de cacao se realizará una prueba ANOVA para evidenciar si existen diferencias significativas entre las medias registradas por día de evaluación.
- Para enfrentamientos como *C. musae* contra hongos provenientes del Bosque protector se evaluará un promedio de crecimiento y porcentaje de inhibición del agente benéfico sobre el fitopatógeno.

Todos estos análisis se respaldan con gráficas visuales de cada enfrentamiento y su respuesta en función del tiempo utilizando el programa R-Studio. Las evaluaciones que no presenten resultados considerados favorables serán justificadas de manera textual.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1. Resultados contra el patógeno *Ralstonia solanacearum*

4.1.1. Enfrentamiento de bacterias antárticas contra el patógeno *R. Solanacearum*

Enfrentamiento Preliminar

Durante la selección preliminar se reportaron 10 de las 25 cepas antárticas con presunta acción inhibitoria **Anexo 1**. No obstante, éstas presentan halos apenas perceptibles y fueron seleccionadas con el propósito de explorar el diámetro de inhibición en su ensayo de confrontación final contra la bacteria *R. solanacearum*.

Enfrentamiento Final

La confrontación final no reportó halo de inhibición alrededor del pocillo de inoculación como podemos observar en la **figura 13** entre la bacteria patógena *Ralstonia solanacearum* y las bacterias extraídas del suelo antártico.

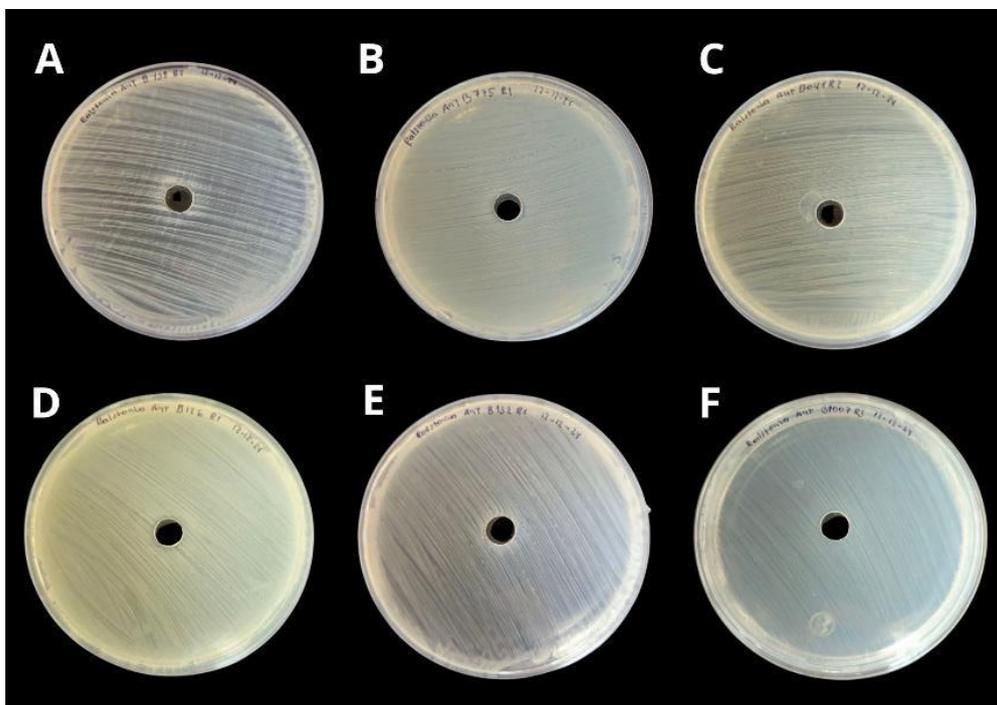


Figura 13. Ensayo de antagonismo entre cepas bacterianas antárticas y *Ralstonia solanacearum*. Se observan las placas sembradas con *R. solanacearum* enfrentada a diferentes cepas antárticas: (a) *Leifsonia antartica*, (b) *Chryseobacterium* sp., (c) *Psychrobacter glacincola*, (d) *Pseudomonas brenneri*, (e) *Filibacter* sp. y (f) *Pseudomonas psychrophile*, inoculadas en el centro.

Al ser microorganismos provenientes de ecosistemas de bajas temperaturas y condiciones de estrés ambiental específicas su expresión metabólica se ve limitada por la ausencia de estas (Jorge et al., 2019). Estudios indican que *R. solanacearum* posee una resistencia muy marcada a diversos agentes antimicrobianos debido a su compleja regulación genética y a su capacidad para formar biopelículas, lo que podría haber contribuido a su prevalencia frente a las bacterias antárticas (Álvarez et al., 2022). La falta de competencia natural, e interacción con comunidades microbianas, podrían ser factores que limiten su actividad metabólica antagonista en condiciones artificiales (Patry, 2021). Los resultados obtenidos subrayan la relevancia de optimizar las condiciones experimentales y de llevar a cabo pruebas complementarias para una evaluación exhaustiva del potencial biotecnológico de las bacterias antárticas en su interacción con fitopatógenos, tales como *R. solanacearum*.

4.1.2 Enfrentamiento de bacterias extraídas de la fermentación del cacao contra el patógeno *R. Solanacearum*

Enfrentamiento preliminar

Tras la evaluación preliminar siguiendo el criterio de inclusión de Antonia Vázquez et al (2022), se seleccionaron 9 cepas de bacterias fermentadoras de cacao que presentaron un halo de inhibición en el enfrentamiento realizado contra el patógeno *Ralstonia solanacearum*. Los detalles específicos de estas cepas se encuentran en el **Anexo 3**.

Enfrentamiento final

En el enfrentamiento entre *R. solanacearum* y bacterias provenientes de la fermentación de cacao, se observa actividad inhibitoria. Se realizó la comparativa de los diámetros entre el día uno y el día 3 debido a que este fue el día en el que presentó el mayor nivel de inhibición.

Mediante las pruebas de t-Student pareadas realizadas pudimos reconocer que las bacterias *Acetobacter ghanensis* y *Bacillus cereus* presentan una diferencia significativa entre su primer y tercer día de medición pues su valor de *p* es menor a 0.05 de acuerdo con Kain y MacLaren (2007). Esto quiere decir que existe una diferencia entre la medida del halo de inhibición de estas bacterias entre el día uno y tres, es decir que estas bacterias alcanzaron su fase estacionaria, donde de presentan una mayor cantidad de metabolitos que inhiben el patógeno, el día tres (**tabla 3**), las demás bacterias evaluadas no presentaron valores

significativos en su comparación a lo largo de los días, lo que quiere decir que su nivel de inhibición se mantuvo similar a lo largo de los días (Falconí et al., 2023).

Tabla 3. Bacterias con valores significativos

Bacteria	Valor p
<i>Acetobacter ghanensis</i>	0.001476
<i>Bacillus cereus</i>	0.0004723

Se realizó la comparación del diámetro de inhibición alcanzado entre el día uno y el día tres para determinar cuáles de estas bacterias presentan una mayor inhibición y por ende mayor potencial de ser empleadas para el control del patógeno *Ralstonia solanacearum*. En las gráficas de barras comparativas (**fig. 14** y **15**) se puede observar el diámetro de inhibición que presentaron el día uno y tres, y las bacterias que demostraron mejor potencial de inhibición (**tabla 2**). Múltiples bacterias presentaron una inhibición que ronda los 20 mm de diámetro. De acuerdo con la literatura en enfrentamientos contra *Ralstonia* se suele considerar un diámetro de entre 15 mm y 20 mm una inhibición alta, lo que sugiere que los resultados obtenidos por algunas cepas son considerados competitivos (Mukeshambala et al., 2024).

Tabla 4. Diámetros de inhibición al tercer día del enfrentamiento de *R. solanacearum* frente a bacterias fermentadoras de cacao.

Nivel de inhibición	Bacterias de la fermentación del cacao	Halo de inhibición en el tercer día de crecimiento (mm)
Alto	<i>Bacillus altitudinis</i>	23.00
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	21.67
	<i>Bacillus licheniformis</i>	20.50
	<i>Bacillus siamensis</i>	21.00
	<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	23.00
Moderado	<i>Bacillus cereus</i>	15.33
	<i>Acetobacter</i> sp.	17.33
	<i>Bacillus velezensis</i>	15.33
	<i>Ralstonia</i> sp.	17.00

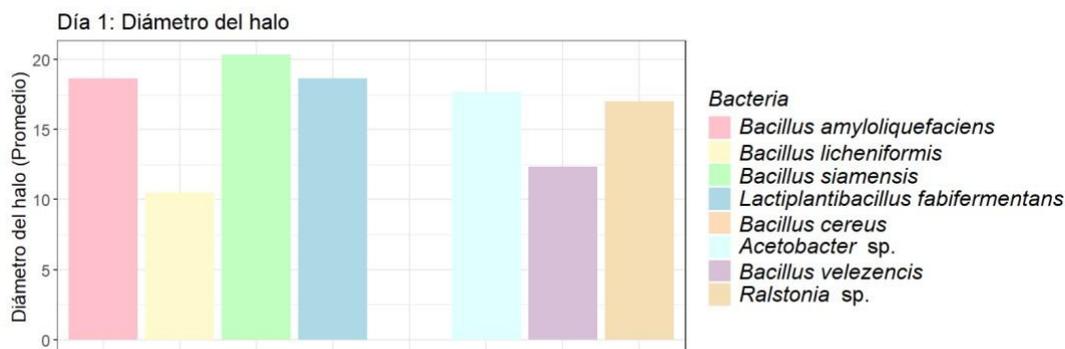


Figura 14. Medida del halo de inhibición obtenida el día uno en el enfrentamiento de las bacterias fermentadoras de cacao para el control de *R. solanacearum*.

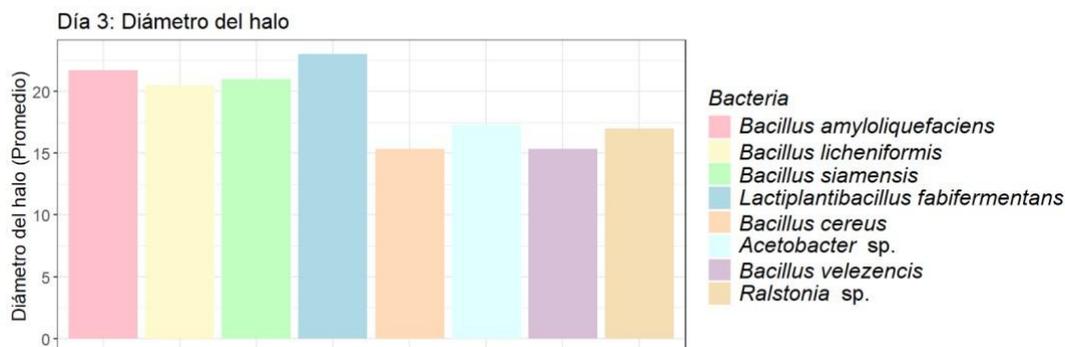


Figura 15. Medida del halo de inhibición obtenida el día tres en el enfrentamiento de las bacterias fermentadoras de cacao para el control de *R. solanacearum*.

Entre las bacterias evaluadas como agentes de biocontrol de *R. solanacearum* encontramos especies como *Lactiplantibacillus fabifermentans*, que a pesar de que se han realizado estudios con bacterias del mismo género esta sería la primera vez que se reporta actividad inhibitoria por parte de *Lactiplantibacillus fabifermentans* contra *R. solanacearum*.

4.1.3 Enfrentamiento de los hongos benéficos extraídos del Bosque protector Prosperina contra el patógeno *R. Solanacearum*

Enfrentamiento Preliminar

El enfrentamiento de hongos filamentosos extraídos del Bosque Protector Prosperina contra la bacteria patógena *R. Solanacearum* demostraron el potencial inhibitorio de dos hongos

pertenecientes al género *Trichoderma*. El criterio de selección consistió en evaluar de forma visual si el hongo benéfico rodeaba o sobrepasaba la bacteria patógena debido a que en la literatura cuando el hongo benéfico recubre a la bacteria patógena y frena su crecimiento se considera que el hongo posee capacidad inhibitoria contra el patógeno (Pico Rosado et al., 2024). Las especies en fueron *Trichoderma inhamatum* y *Trichoderma spirale*.

Enfrentamiento final

Frente al patógeno *R. solanacearum* se evaluaron dos hongos benéficos extraídos del suelo de Bosque Protector Prosperina seleccionados durante la fase preliminar; ambos del género *Trichoderma* (**Anexo 5**).

En el enfrentamiento de *Trichoderma inhamatum* se evaluó el diámetro micelial del hongo benéfico en presencia del patógeno *R. solanacearum*, y el diámetro micelial de *T. inhamatum* en solitario. Se compararon dichos diámetros a lo largo de cuatro días, cuando el hongo recubrió todo el espacio de la caja Petri. Estas medidas se encuentran reportadas en la **tabla 5**. Además, en la **figura 16** se aprecia que el hongo llegó a su crecimiento máximo en enfrentamiento y en solitario con la diferencia de que el hongo que controló al patógeno tardó un día más en hacerlo. *Trichoderma inhamatum* recubrió la bacteria patógena e inhibió su crecimiento al rodearla como se observa en la **figura 18** específicamente en el literal d.

Tabla 5. Evaluación de *T. inhamatum* en respuesta antagónica frente a *R. solanacearum*

Diámetro del micelio de <i>Trichoderma inhamatum</i> (mm)				
Cepa	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Diámetro <i>Ralstonia con T.inhamatum</i>	28,33	53,67	55	85
Diámetro control <i>T.inhamatum</i>	33,33	76,33	85	85

Nota. Se midió el diámetro del hongo promisor *T. inhamatum* en el enfrentamiento in vitro con *R. solanacearum* y el diámetro de este mismo hongo promisor en un control sin la presencia del patógeno.

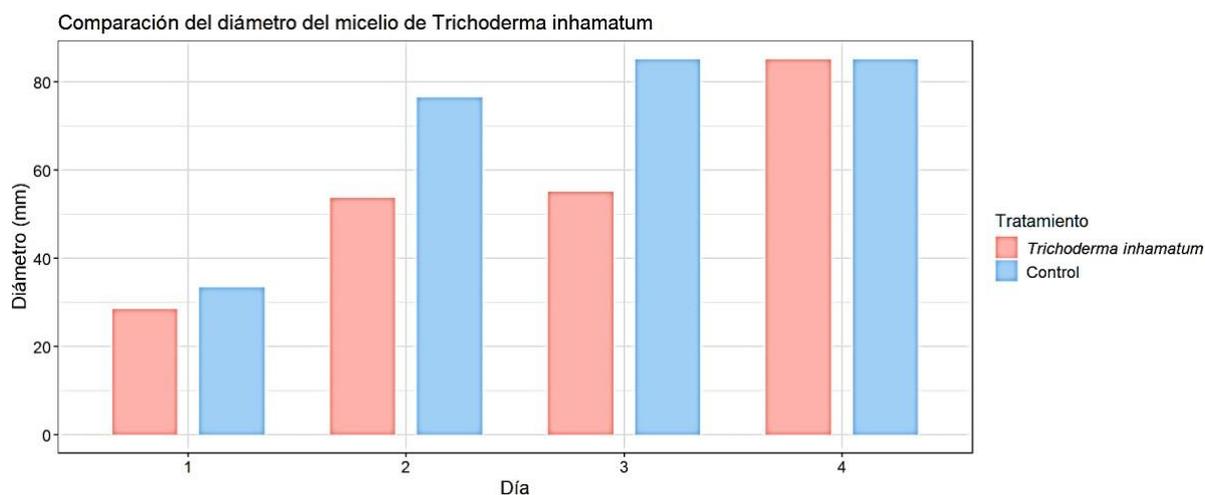


Figura 16. Gráfica de barras comparativa del diámetro del control (micelio de *Trichoderma inhamatum* solo) y el diámetro de *Trichoderma inhamatum* en el enfrentamiento contra *Ralstonia solanacearum*.

Trichoderma spirale presentó resultados similares a *Trichoderma inhamatum* recubriendo por completo la caja Petri el día cuatro y frenando el crecimiento de *R. solanacearum*. Para este microorganismo tanto el control (*Trichoderma spirale* en solitario) como el tratamiento de *Trichoderma spirale* junto a la bacteria patógena alcanzaron su crecimiento máximo el día cuatro (**tabla 6** y **figura 17**). Podemos observar el recubrimiento de esta bacteria en la **figura 18** en el literal a.

Tabla 6. Evaluación de respuesta antagónica de *T. spirale* frente a *R. solanacearum*

Diámetro del micelio de <i>Trichoderma spirale</i> (mm)				
Cepa	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Diámetro con <i>T. spirale</i>	17,33	26,67	54	85
Diámetro control <i>T. spirale</i>	18,33	31	54	85

Nota. Se midió el diámetro del hongo promisor *T. spirale* en el enfrentamiento *in vitro* con *R. solanacearum* y el diámetro de este mismo hongo promisor en un control sin la presencia del patógeno.

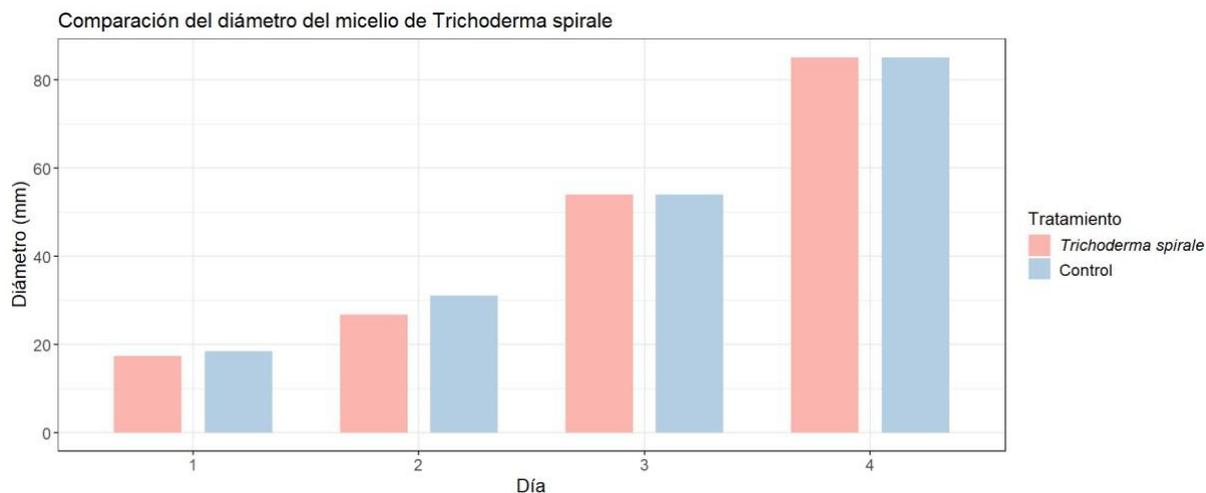


Figura 17. Gráfica de barras comparativa del diámetro del control (micelio de *Trichoderma spirale* solo) y el diámetro de *Trichoderma spirale* en el enfrentamiento.

Esta inhibición se podría atribuir a que se ha reportado que los hongos del género *Trichoderma* cuentan con mecanismos directos e indirectos de biocontrol como la competencia por nutrientes, antibiosis o la inducción de resistencia sistémica, incluso se ha reportado micoparasitismo mediante enzimas que degradan las paredes celulares de patógenos y compuestos bioactivos que inhiben el crecimiento de patógeno (Benítez et al., 2004; Hamid et al., 2024; Junior et al., 2023). Estos hallazgos van de la mano con múltiples estudios en los cuales se ha empleado *Trichodermas* para el control de este mismo patógeno *Ralstonia solanacearum*, confirmando una vez más el gran potencial de estos hongos como agentes de biocontrol de fuertes patógenos como lo es *R. solanacearum* (Pico Rosado et al., 2024)(Vargas Baquero et al., 2020).

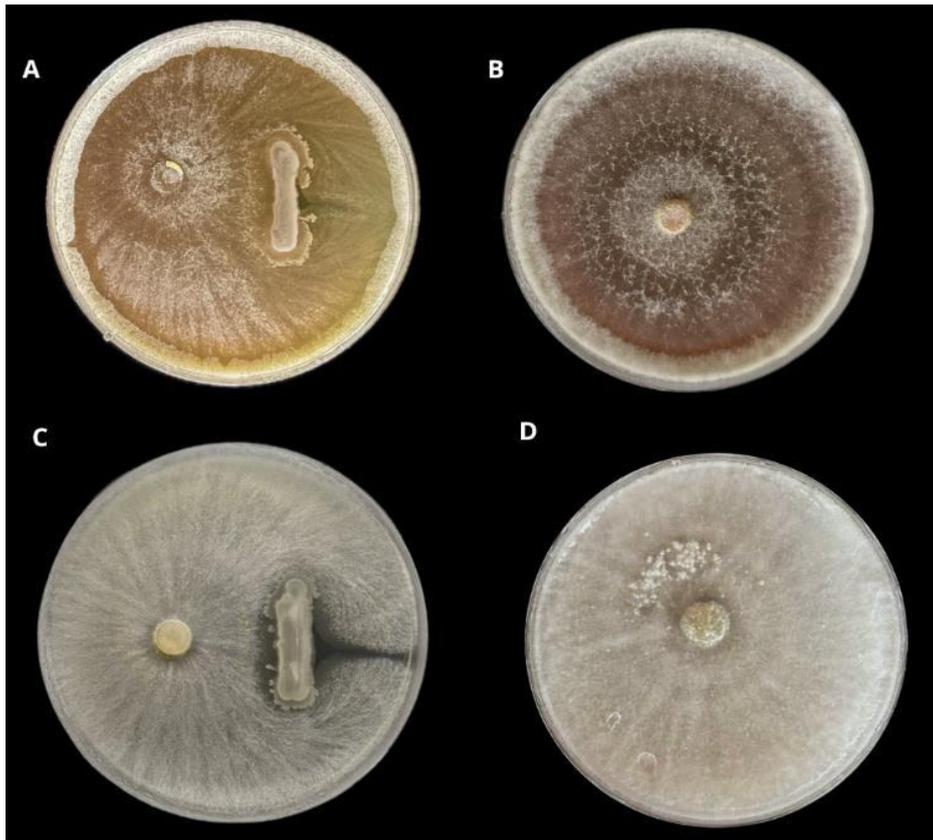


Figura 18. Enfrentamiento individual contra *R. solanacearum* *in vitro*. (A) *Trichoderma spirale*, (B) Control *Trichoderma spirale*, (C) *Trichoderma inhamatum*, (D) Control *Trichoderma inhamatum*.

4.2 Resultados contra el patógeno *Colletotrichum musae*

4.2.1 Enfrentamiento de bacterias benéficas antárticas contra el patógeno *Colletotrichum musae*

Enfrentamiento Final

En la evaluación individual, se seleccionaron nueve de las veinticinco cepas antárticas para enfrentamientos individuales con el propósito de evidenciar un mejor desempeño frente al fitopatógeno *C. musae*. Sin embargo, no se reportó un efecto inhibitorio por parte del agente benéfico **tabla 7**.

Tabla 7. Evaluación cualitativa del efecto inhibitorio en bacterias antárticas frente a *C. musae*

Procedencia	Cepa	Efecto inhibitorio	
		Positivo (+)	Negativo (-)
Suelo antártico	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		-
	<i>Pseudomonas yamanorum</i>		-
	<i>Filibacter</i> sp.		-
	<i>Pseudomona rhodesiae</i>		-
	<i>Streptomycesnojiriensis</i>		-
	<i>Pseudomonas Frederickbergensis</i>		-
	<i>Pseudomonas</i> sp.		-
	<i>Pseudomonas caspiana</i>		-
	<i>Pseudomonas kitaguniensis</i>		-

C. musae mostró un crecimiento paralelo a su control creando una disminución diaria de la distancia hacia la bacteria en milímetros hasta alcanzar cero, logrando cubrir por completo la bacteria a partir del cuarto día de evaluación. Existen géneros específicos que han reportado inhibición en confrontaciones siguiendo la misma metodología. Santos et al. (2020) evaluó la respuesta antagónica de actinobacterias frente a los fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, entre otros. El género *Arthrobacter* fue el principal antagonista gracias a la producción de antibióticos logrando alcanzar un 53%. También recalca la importancia del medio, puesto que ciertos mecanismos se manifiestan dependiendo del sustrato, un factor a considerar en futuros ensayos.

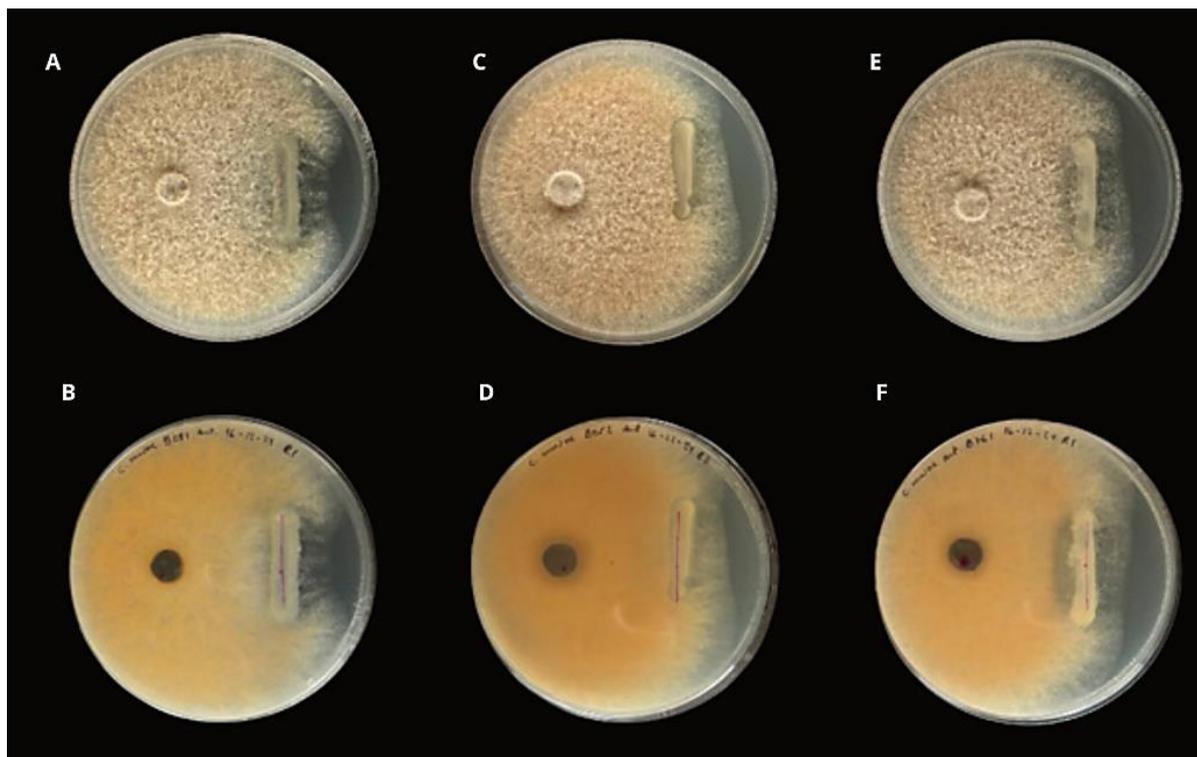


Figura 19. Enfrentamiento entre *C. musae* y cepas antárticas al cuarto día de incubación en medio de cultivo. Se presentan imágenes tomadas desde la parte superior e inferior de la misma placa Petri para observar la interacción entre los microorganismos. (A) *Pseudomona yamanorum* vista desde la parte superior de la placa, (B) *Pseudomona yamanorum* vista desde la parte inferior. (C) *Pseudomona kitaguniensis* vista desde la parte superior de la placa, (D) *Pseudomona kitaguniensis* vista desde la parte inferior, (E) *Streptomyces norijiensis* vista desde la parte superior de la placa y (F) *Streptomyces norijiensis* vista desde la parte inferior.

4.2.2 Enfrentamiento de bacterias benéficas extraídas de la fermentación del cacao contra el patógeno *Colletotrichum musae*

Enfrentamiento Preliminar

En el enfrentamiento múltiple de bacterias antárticas frente a *C. musae*, un indicador clave para determinar actividad antagonista es observar una distancia definida entre ambos microorganismos, es decir, inhibición por parte de la cepa promisoría. Este criterio se estableció con base en los lineamientos descritos por Suasnavas (2017). La tabla de bacterias seleccionadas se encuentra en el **Anexo 9**.

Enfrentamiento Final

Se realizó una prueba ANOVA para evaluar el valor de significancia de las mediciones realizadas en este enfrentamiento, se empleó el software informático RStudio. Además, se realizó la prueba de Tukey para evaluar el valor de significancia entre cada bacteria y el control.

Tabla 8. Valores de significancia de la prueba estadística ANOVA

Fuente de variación	Valor <i>p</i>
Bacteria	<0.001
Día	<0.001
Bacteria:Día	<0.001

Los valores *p* corresponden a <0.001 (**tabla 8**), por este motivo se considera que los valores son significativos. Se realizó la prueba de Tukey para comparar la significancia de cada bacteria promisorio frente al control de *C. musae* (**tabla 9**).

Tabla 9. Valores *p* de la prueba de Tukey

Comparación	p-valor
<i>Bacillus sp.</i> - Control	<0.0001
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i> - Control	<0.0001
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> - Control	<0.0001

Los valores *p* obtenidos en la **tabla 9** demuestran que hubo una diferencia significativa entre cada bacteria y el control de *C. musae*. Se puede observar en la **figura 20** la diferencia del promedio del hongo patógeno *C. musae* cuando es confrontado con las bacterias fermentadoras de cacao con el diámetro de este patógeno al ser sembrado sin presencia de dichas bacterias.

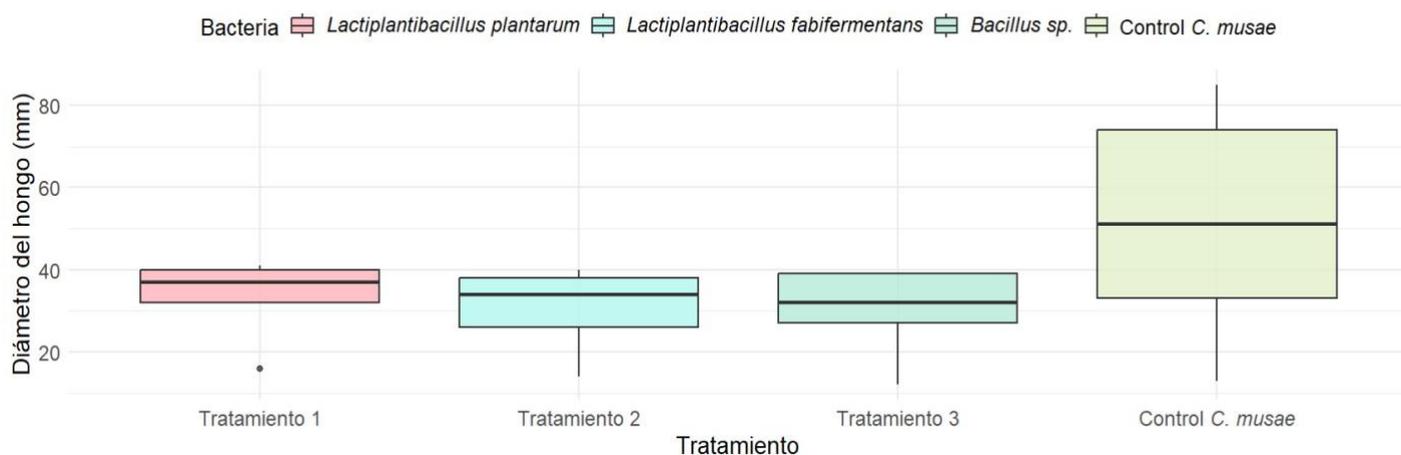
Comparación de diámetros de *C. musae* en cada tratamiento

Figura 20. Gráfica de cajas y bigotes del diámetro de *C. musae* enfrentado por las bacterias fermentadoras de cacao y el control (*C. musae* en solitario).



Figura 21. Enfrentamiento *C. musae* contra bacterias fermentadas de cacao. (A) *Lactiplantibacillus plantarum* vista desde la parte superior de la placa, (B) *Lactiplantibacillus plantarum* vista desde la parte inferior, (C) *Bacillus sp.* (D) *Bacillus sp.* vista desde la parte inferior, (E) *Lactiplantibacillus fabifermentans* vista desde la parte superior de la placa, (F) *Lactiplantibacillus fabifermentans* vista desde la parte inferior. Se observa una zona clara de inhibición del fitopatógeno en presencia de las bacterias antagonistas.

4.2.3 Enfrentamiento de los hongos benéficos extraídos del Bosque protector Prosperina contra el patógeno *Colletotrichum musae*

Enfrentamiento preliminar

En la selección preliminar se analizó de forma cualitativa el comportamiento de cada cepa con presunta actividad antagonista y se seleccionaron para el enfrentamiento final aquellos hongos del Bosque protector Prosperina que evidenciaron una respuesta de interacción física o competencia de nutrientes inhibiendo el crecimiento de *C. musae* (Martínez et al., 2014). Las cepas de hongos promisorios seleccionados se encuentran detallado en el **anexo 11 y 12**.

Enfrentamiento final

En la fase preliminar gran parte de los hongos no mostraron actividad antagonista, evidenciando crecimiento micelial por parte de *Colletotrichum musae*. La cepa seleccionada para la fase final fue *Trichoderma inhamatum*.

Tabla 10. Evaluación de respuesta antagónica de *T. inhamatum* frente a *C. musae*

	Diámetro del micelio de <i>C. musae</i> (mm) Cepa				Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
	<u>% Inhibición de crecimiento micelial</u>								
Diámetro con <i>T. inhamatum</i>	11,3	18	27,6	39	39			54,11	
Diámetro control <i>C. musae</i>	12,6	32,6	49,6	71,6	85				

Los resultados muestran diferencias significativas en el crecimiento de *C. musae* en presencia de *T. inhamatum* en comparación con su control. El promedio del diámetro de crecimiento se calculó a partir de los valores obtenidos a diario por cada réplica (R1, R2, R3). Su control alcanzó 71,6 mm en el día 4, mientras que en presencia de *T. inhamatum*, el crecimiento se frenó, alcanzando solo 39 mm al día 4. A partir del día 5, su micelio cubrió por completo al fitopatógeno como se observa en la **figura 22**.

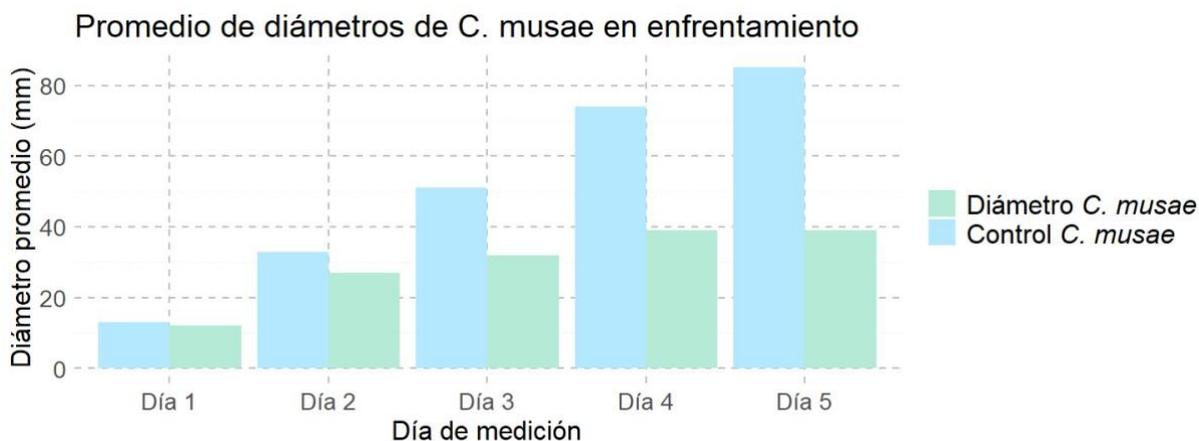


Figura 22. Gráfico de barras del diámetro del patógeno *C. musae* contra *T. inhamatum* y control a lo largo del tiempo (Día 1 a Día 5).

El porcentaje de inhibición de crecimiento micelial total al día 5 que ejerció *T. inhamatum* sobre *C. musae* alcanzó un valor mayor al 50%, reportando una alta capacidad antagónica similar a los resultados reportados en el estudio de Caneloríguez et al. (2017), quien evaluó *Trichoderma harzianum* para el control del hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* agente causal del Tizón en cultivos de *Aloe vera* L. obteniendo valores entre un 50 a 90 % de inhibición. La versatilidad del género *Trichoderma* no solo actúa contra fitopatógenos del cultivo de banano, potenciando su versatilidad de aplicación para el control de enfermedades en cultivos de alto valor agroeconómico.

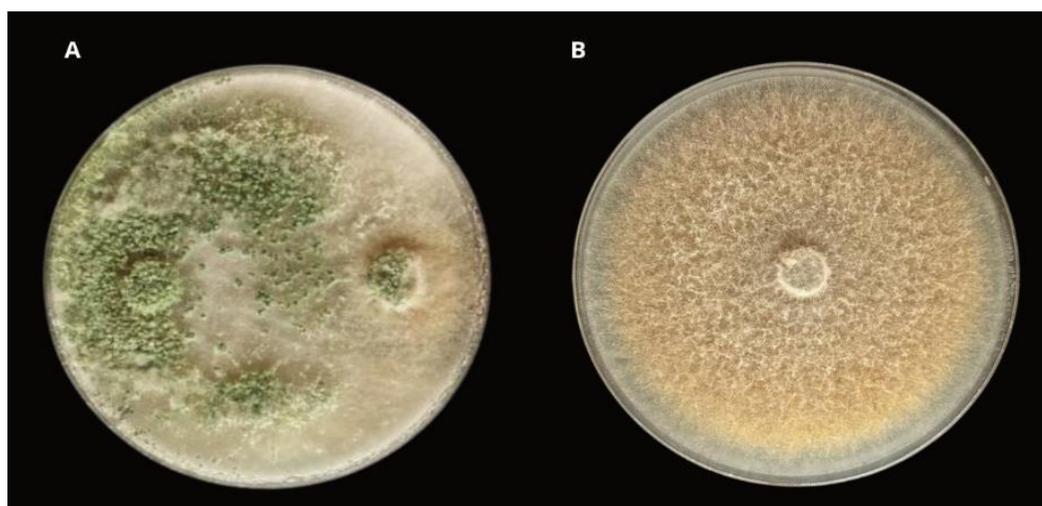


Figura 23. (A) Colonización de *T. inhamatum* contra *C. musae*, (B) Control *C. musae* durante el quinto día de evaluación.

Los hongos del género *Trichoderma* han sido estudiados por su capacidad para secretar gran variedad de metabolitos secundarios durante su fase estacionaria. Entre estos compuestos se encuentran los peptaiboles, que destruyen las membranas celulares, y la gliotoxina, asociado a la interferencia de respiración celular generando como resultado señales químicas capaces de inhibir el desarrollo de organismos patógenos (Conrado Meyer et al., 2022, pp. 182–210).

4.3 Resultados contra el patógeno *Pseudocercospora fijiensis*

4.3.1 Enfrentamiento de bacterias de bacterias antárticas benéficas contra el patógeno *Pseudocercospora fijiensis*

Las 25 bacterias aisladas de suelos antárticos no lograron reportar capacidad inhibitoria frente al fitopatógeno *P. fijiensis*. Durante los ensayos se registró un crecimiento continuo del diámetro del patógeno en milímetros dentro de las cajas Petri, reportado en la **tabla 11**.

Tabla 11. Evaluación cualitativa del efecto inhibitorio en bacterias antárticas frente a *P. fijiensis*

Procedencia	Grupo	Cepas	Efecto Inhibitorio	
			Positivo (+)	Negativo (-)
Suelo Antártico	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
		<i>Pseudomonas paraversuta</i>		-
		<i>Janthinobacterium</i> sp.		
		<i>Filibacter</i> sp.		
	2	<i>Arthobacter</i> sp.		
		<i>Janthinobacterium lividium</i>		-
		<i>Ralstonia pickettii</i>		
		<i>Leifsonia antarctica</i>		
	3	<i>Pseudomona numensis</i>		
		<i>Janthinobacterium tructae</i>		-
		<i>Pseudomonas silesiensis</i>		
		<i>Chryseobacterium</i> sp.		
	4	<i>Arthobacter livingstonensis</i>		
		<i>Rhodoccus</i> sp.		-
		<i>Pseudomonas</i> sp.		
<i>Pseudomonas kitaguniensis</i>				
5		<i>Psychrobacter glacincola</i> <i>Pseudomona rhodesiae</i>		-

	<i>Streptomycesnojiriensis</i>	
	<i>Pseudomonasbrenneri</i>	
	<i>Pseudomonascaspiana</i>	
6	<i>Pseudomonaspsychrophila</i> <i>Pseudomonasyamanorum</i>	-
	<i>Pseudomonasantartica</i>	
7	<i>frederickbergensis</i> <i>Pseudomonas</i>	-

La ausencia de actividad biocontroladora reportada podría estar asociada a factores como producción insuficiente de metabolitos secundarios bajo las condiciones establecidas en las pruebas *in vitro*, limitando la manifestación y eficacia de los compuestos bioactivos frente al patógeno (Cruz-Martín et al., 2022). Además, la competencia nutricional de ambos microorganismos en el medio de cultivo pudo influir en la actividad metabólica de las bacterias benéficas (Cotes et al., 2018).

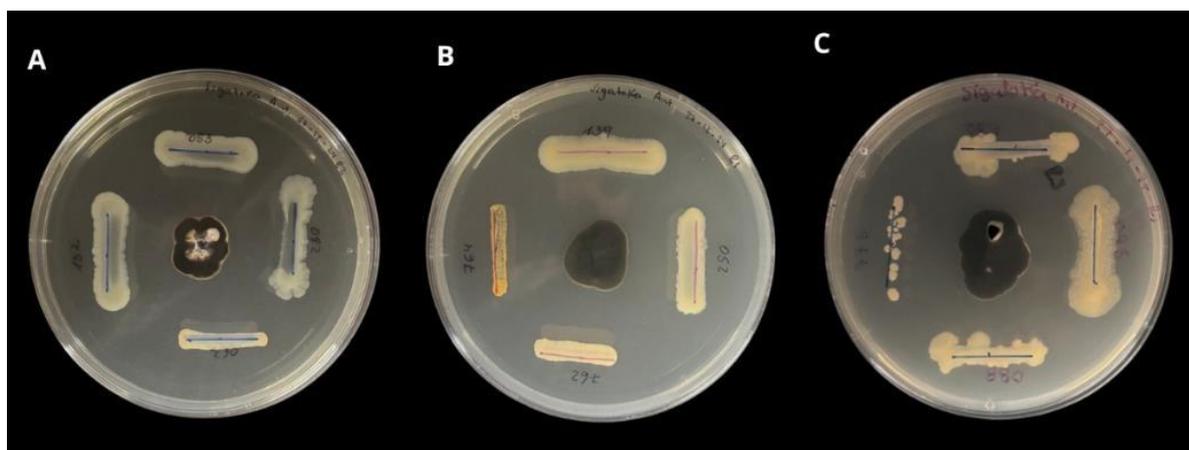


Figura 24. Ausencia de interacción observable entre Sigatoka negra y cepas antárticas después de 4 días de incubación a 28°C en diferentes configuraciones en sentido de las manecillas del reloj, comenzando desde la posición superior (A) *Pseudomonas fluorescen*, *Pseudomonas paraversuta*, *Janthinobacterium* sp. y *Filibacter* sp., (B) *Arthobacter livingstonensis*, *Rhodoccus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Pseudomonas kitaguniensis*, (C) *Pseudomonas numensis*, *Janthinobacterium tructae*, *Pseudomonas silesiensis* y *Chryseobacterium* sp.

En cepas de ambientes extremófilos es posible que las condiciones experimentales llevadas a cabo en el ensayo no fueron lo suficientemente favorables para la síntesis de compuestos bioactivos. Esto puede atribuirse a su adaptación a temperaturas cercanas a los 0 °C, propias de su nicho ecológico (Goordial et al., 2019). En particular, *P. fijiensis* presenta una alta demanda nutricional de compuestos específicos, como hidratos de carbono y aminoácidos esenciales debido a su lento desarrollo micelial dando como resultado una baja disponibilidad para las bacterias (Marcano et al., 2024). Estos enfrentamientos resaltan la complejidad de las interacciones de competencia entre microorganismos.

4.3.2 Enfrentamiento de bacterias benéficas extraídas de la fermentación del cacao contra el patógeno *Pseudocercospora fijiensis*

Las 30 cepas provenientes de fermentados de cacao no lograron demostrar indicios de inhibición hacia el patógeno de *P. fijiensis*. Este mantuvo un crecimiento constante durante el período de evaluación de siete días sin presentar alteraciones visibles en su desarrollo micelial.

Tabla 12. Evaluación cualitativa del efecto inhibitorio en bacterias de cacao frente a *P. fijiensis*

Procedencia	Grupo	Cepas	Efecto inhibitorio		
			Positivo (+)	Negativo (-)	
Fermentados de cacao	1	<i>Acetobacter ghanensis</i>			
		<i>Acetobacter papayae</i>		x	
		<i>Acetobacter pasteurianus</i>			
		<i>Bacillus altitudinis</i>			
	2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			
		<i>Bacillus cereus</i>		x	
		<i>Bacillus licheniformis</i>			
		<i>Bacillus siamensis</i>			
	3	<i>Bacillus sp.</i>			
		<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>		x	
		<i>Priestia megaterium</i>			
	4	<i>Acetobacter oryzoeni</i>			
		<i>Bacillus paramycoides</i>			
			<i>Acetobacter tropicalis</i>		x

	<i>Staphylococcus capitis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	
5	<i>Paenibacillus vulneris</i> <i>Paenibacillus acanthi</i> <i>Liquoribacillus mali</i> <i>Brevibacillus formosus</i>	x
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Levilactobacillus brevis</i>	x
	<i>Acetobacter</i> sp. <i>Bacillus velezensis</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	_____
	<i>Leuconostoc</i>	
7	<i>pesudonomesenteroides</i>	x
	<i>Paenibacillus yunnansis</i>	
	<i>Ralstonia</i> sp. <i>Sphingomonas panni</i>	_____
8	<i>Staphylococcus epidermis</i>	x

Nota. *P. fijiensis* mantuvo un crecimiento constante durante el período de evaluación de siete días sin presentar alteraciones visibles en su desarrollo micelial.

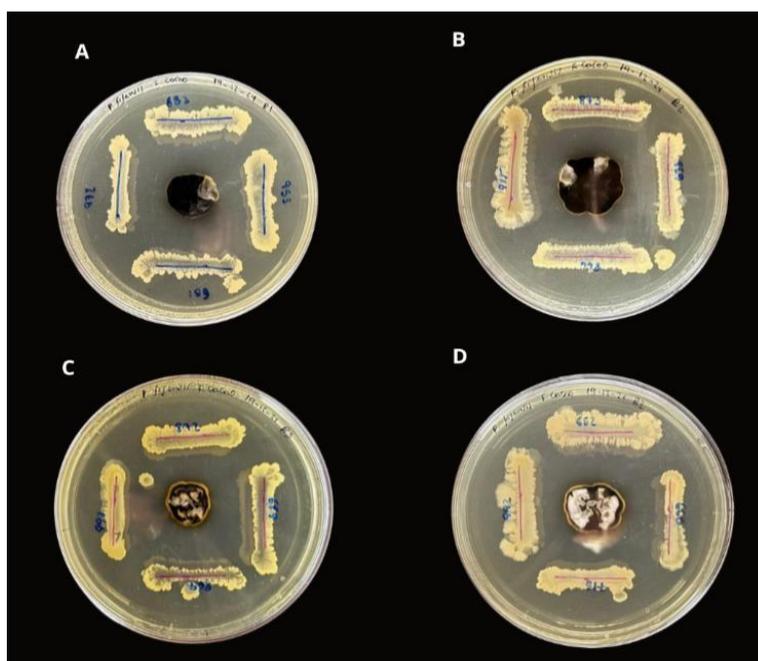


Figura 25. Ausencia de inhibición observable entre *Sigatoka negra* y bacterias obtenidas de la fermentación de cacao después de 4 días de incubación a 28°C en diferentes configuraciones en sentido de las manecillas del reloj, comenzando desde la posición superior: (A) *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter papayae*, *Acetobacter pasteurianus* y *Bacillus altitudinis*, (B) *Paenibacillus vulneris*, *Paenibacillus acanthi*, *Liquoribacillus mali* y *Brevibacillus formosus*, (C) *Lactobacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Acetobacter sp.* y *Bacillus velezensis* (D) *Bacillus paramycooides*, *Acetobacter tropicalis*, *Staphylococcus capitis* y *Bacillus subtilis*.

4.3.3 Enfrentamiento de los hongos benéficos extraídos del Bosque protector Prosperina contra el patógeno *Pseudocercospora fijiensis*

Enfrentamiento final

Durante la evaluación del enfrentamiento final entre hongos filamentosos aislados del Bosque Protector Prosperina y *P. fijiensis*, tres de las seis cepas evaluadas demostraron actividad antagónica frente al fitopatógeno **tabla 13**. Este efecto se evidenció mediante el freno del crecimiento en el diámetro del agente patógeno en comparación con el control a partir del cuarto día. El promedio del diámetro de crecimiento fue calculado a partir de los valores diarios registrados para cada réplica.

Tabla 13. Evaluación de respuesta antagónica de hongos benéficos frente a *P. fijiensis*

Diámetro del micelio de <i>P. fijiensis</i> (mm)				
Cepa	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Diámetro con <i>T. inhamatum</i>	18,5	19,5	19,5	20
Diámetro con <i>Absidia sp.</i>	15	15	15,5	16
Diámetro con <i>T. spirale</i>	17,5	19,5	19,5	19,5

Diámetro control				
<i>P. fijiensis</i>	21,3	23	23,3	24,3

Durante la evaluación del enfrentamiento final entre hongos filamentosos aislados del Bosque Protector Prosperina y *P. fijiensis*, tres de las seis cepas evaluadas demostraron actividad antagónica frente al fitopatógeno. Este efecto se evidenció mediante el freno del crecimiento en el diámetro del agente patógeno en comparación con el control a partir del cuarto día, manteniéndose constante hasta el final del periodo de evaluación esto se encuentra representado en la **figura 27**, en el gráfico se observa el progreso de los tres tratamientos, es decir, los hongos benéficos *T. inhamantum*, *T. spirale* y *Absidia* sp.

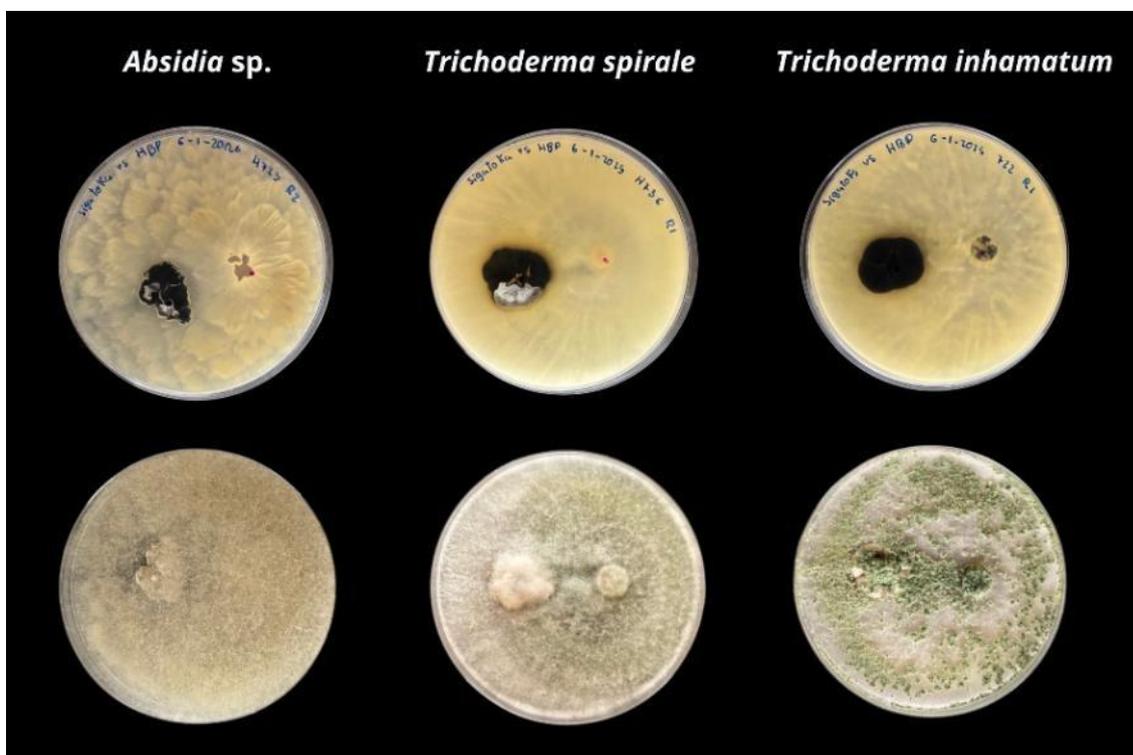


Figura 26. Interacción in vitro entre *P. fijiensis* y hongos *T.inhamatum*, *T. spirale* y *Absidia* sp.

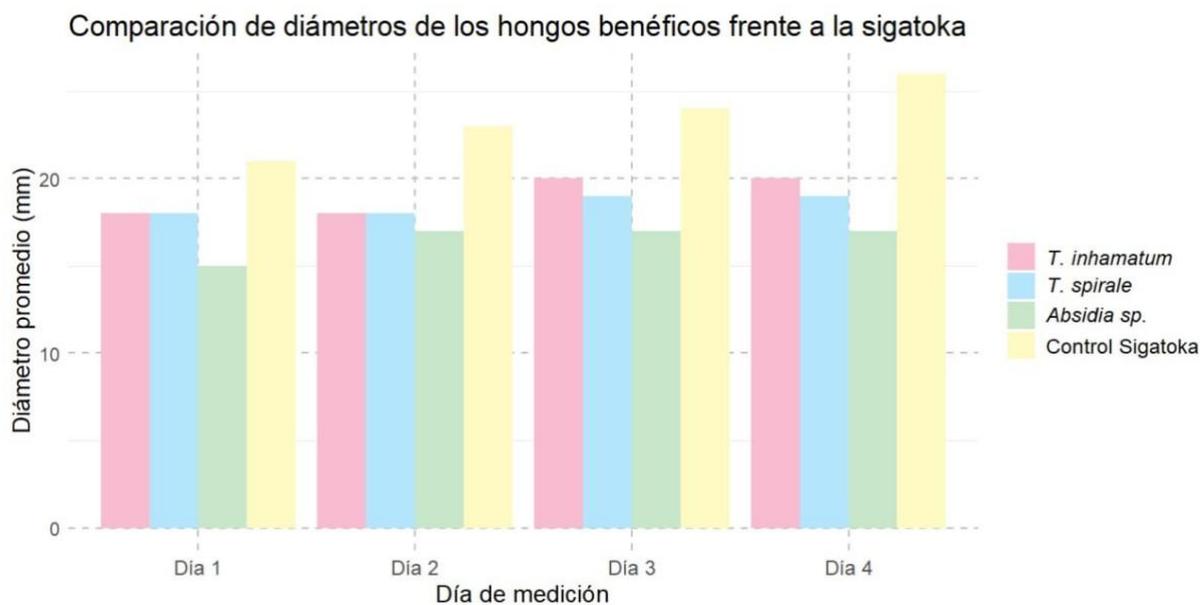


Figura 27. Gráfico de barras del diámetro del patógeno *P. fijiensis* en presencia de hongos antagonistas y su diámetro en el control.

Las cepas benéficas podrían haber implementado un mecanismo de micoparasitismo mediante el desarrollo de hifas con estructuras especializadas, conocidas como apresorios, y la secreción de enzimas hidrolíticas que funcionaron inhibiendo el crecimiento normal del fitopatógeno (Conrado Meyer et al., 2022, pp. 182–210).

Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusión

Los enfrentamientos realizados presentaron resultados variados dependiendo de la cepa promisoría y el patógeno enfrentado. De los 61 microorganismos aplicados se obtuvo una respuesta eficiente alrededor del 30%. Las bacterias extraídas del proceso fermentativo del cacao siendo *Bacillus* sp, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus siamensis*, *Lactiplantibacillus fabifermentans*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bacillus cereus*, *Acetobacter* sp., *Bacillus velezensis*, *Ralstonia* sp. fueron las que causaron mayor inhibición a los patógenos *R. solanacearum* y *C. musae*. En el caso del patógeno *P. fijiensis* el grupo de microorganismos que presentó actividad antagonista fueron los hongos filamentosos encontrados en el Bosque Protector Prosperina. En este ensayo las cepas *Trichoderma inhamatum*, *Trichoderma spirale* y *Absidia* sp. lograron frenar el crecimiento de la sigatoka (*P. fijiensis*). Además, las *Trichodermas* evaluadas demostraron ser efectivas en el control de la bacteria patógena *R. solanacearum*, frenando su crecimiento al rodearla por completo.

Los microorganismos aislados de suelos antárticos no presentaron actividad antagonista frente a los fitopatógenos evaluados, por lo que no se perfilan como la opción más viable para bioinsumos en climas tropicales. Sin embargo, dado que estas bacterias son de naturaleza psicrófilo, su potencial bioactivo podría estar limitado por temperaturas elevadas de climas tropicales. No obstante, podrían ser considerados alternativas prometedoras contra patógenos que se desarrollan en climas fríos y otros factores de estrés abiótico específicos de los ecosistemas antárticos.

En nuestros resultados preliminares múltiples microorganismos mostraron mejores efectos inhibitorios que durante su evaluación final, atribuimos esto a que durante la evaluación preliminar actuaban múltiples microorganismos en la inhibición del patógeno, demostrando el potencial de estos como posibles candidatos para la elaboración de consorcios para el control de fitopatógenos.

Para concluir, aquellos géneros de hongos y bacterias que reportaron eficiencia se plantean como futuras alternativas sostenibles y ecológicas para el control de fitopatógenos,

logrando generar beneficios al sector agrícola al reducir la dependencia de agroquímicos. Estos hallazgos fomentan la investigación científica especializada, abriendo nuevas oportunidades para el diseño de bioinsumos innovadores.

5.2 Recomendaciones

Durante la selección preliminar de agentes de biocontrol, se recomienda realizar enfrentamientos *in vitro* de forma múltiple para evaluar la posibilidad de la producción de consorcios con estos microorganismos promisorios y de forma individual para evidenciar si existe una respuesta antagonista más concreta.

Considerar nuevos parámetros de evaluación como la concentración óptima de las bacterias promisorias en futuros ensayos, ya que este factor puede influir en su eficacia de respuesta antagónica frente a fitopatógenos.

Se recomienda que en futuros ensayos se realice la determinación de metabolitos producidos por los microorganismos promisorios, con el fin de determinar a qué compuestos se les atribuye la capacidad inhibitoria.

Referencias bibliográficas

Ali, A., Iftikhar, Y., Mubeen, M., Ali, H., Zeshan, M., Asad, Z., Zafar-ul-Hye, M., Abdul Rehman, M., Abbas, M., Rafique, M., & Usman Ghani, M. (2022). Antagonistic potential of bacterial species against fungal plant pathogens and their role in plant growth promotion (PGP): A review. *Phyton*, 91(9), 1859–1877. <https://doi.org/10.32604/phyton.2022.021734>

- Álvarez, B., López, M. M., & Biosca, E. G. (2022). *Ralstonia solanacearum* facing spreaddetermining climatic temperatures, sustained starvation, and naturally induced resuscitation of viable but non-culturable cells in environmental water. *Microorganisms*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122503>
- Ayaz, M., Li, C.-H., Ali, Q., Zhao, W., Chi, Y.-K., Shafiq, M., Ali, F., Yu, X.-Y., Yu, Q., Zhao, J.-T., Qi, R.-D., & Huang, W.-K. (2023). Bacterial and fungal biocontrol agents for plant disease protection: Journey from lab to field, current status, challenges, and global perspectives. *Molecules*, 28(18). <https://doi.org/10.3390/molecules28186735>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249–260.
- Biosca, E. G., López, M. M., & Álvarez, B. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *ResearchGate*, 1. https://www.researchgate.net/publication/267772811_On_the_life_of_Ralstonia_solanacearum_a_destructive_bacterial_plant_pathogen
- Campanioni, B., Arizmendi, G., & García, R. (2019). *Trichoderma*: Su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotechnología Vegetal*, 19(4), 237–248.
- Carreño, G. P., Quijije, G., Diaz, B., Maridueña, M. G., & Cevallos, J. M. (2023). Identificación de hongos filamentosos asociados al suelo del bosque protegido de Prosperina. *Bionatura*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.21931/rb/2023.08.01.22>
- Cesa, C., Baez, A., Quintero, V., De la Cruz, J., Castañeda, M., & Muñoz, J. (2020). The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 140–154.

<https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.76867>

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>

Conrado Meyer, M., Mazado, S. M., & Da Silva, J. C. (2022). *Trichoderma*: Su uso en la agricultura. En *Embrapa.br* (Vol. 1, pp. 182–210). Brasília, DF: Embrapa.

<https://doi.org/978-65-89957-14-0>

Cotes, A., Zapata, Y., Beltrán Acosta, C., Kobayashi, S., Uribe, L., & Elad, Y. (2018). Control biológico de patógenos foliares. *Agrosavia.co*, 1, 56–143. [https://doi.org/10.978-958-740-](https://doi.org/10.978-958-740-253-7)

253-7

Cruz, C., Zelaya, L., Sandoval, G., De los Santos, S., Rojas, E., Chávez, I. F., & Ramírez, S. R. (2021). Utilización de microorganismos para una agricultura sostenible en México: Consideraciones y retos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(5), 899–913.

<https://doi.org/10.29312/remexca.v12i5.2905>

Cruz-Martín, M., Rocha, E., Acosta-Suárez, M., Pichardo, T., Rodríguez, E., Roque, B., &

Alvarado-Capó, Y. (2022). Role of *Bacillus pumilus* chitinases in antifungal activity against *Pseudocercospora fijiensis* Morelet. *Journal of Natural Pesticide Research*, 3, 100019.

<https://doi.org/10.1016/j.napere.2022.100019>

Espejo, J. M. (2022). Selección de hongos con capacidad probiótica [Tesis doctoral].

Universidad de Almería. <http://hdl.handle.net/10835/17503>

Essia Ngang, J. J., Yadang, G., Sado Kamdem, S. L., Kouebou, C. P., Youte Fanche, S. A., Tsochi Kougan, D. L., Tsoungui, A., & Etoa, F. X. (2015). Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A-producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol Science and Technology*, 25(3), 245–259. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.969195>

Falconí, C. E., Yáñez-Mendizábal, V., Haro, R. J., & Claudio, D. R. (2023). Inoculum of a native microbial starter cocktail to optimize fine-aroma cocoa (*Theobroma cacao*) bean fermentation. *Agronomy*, 13(10), 2572. <https://doi.org/10.3390/agronomy13102572>

García, R., Kerns, J., & Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* species complex: A quick diagnostic guide. *Plant Health Progress*, 20(1), 7–13. <https://doi.org/10.1094/php-0418-0015-dg>

González, M., Puertas, A., Jiménez, M., Hechavarría, D., & López, S. (2017). Uso de *Trichoderma harzianum* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en el cultivo de sábila (*Aloe vera* L.). *Revista Arbitrada Interdisciplinaria Koinonía*, 2. <https://www.redalyc.org/pdf/5768/576866904005.pdf>

Gaviria, C. (2023). Aislamiento y caracterización de aislados del género *Bacillus spp.* con potencialidades de bioestimulación del crecimiento vegetal de cultivos de plátano.

Universidad Libre Seccional Pereira.

<https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/25702>

Hamid, S., Mir, S. S., Surma, S. B., Parveen, S., Padder, B. A., Dar, G. H., & Shah, M. D. (2024a). *Trichoderma* as a proficient biocontrol agent for phytopathogenic fungi – Mechanism of action and genetic advances. *Applied Biological Research*, 26(1), 1–17.

<https://doi.org/10.48165/abr.2024.26.01.1>

IBM. (2024, febrero 29). Valor de significación. Documentación de IBM.
<https://www.ibm.com/docs/es/cognos-analytics/11.1.0?topic=terms-significance-value>

Ilich Aguirre, S., Carlos Andrade, A., & Santiago Segovia, L. (2024). Informe de resultados de comercio exterior primer trimestre de 2023. Banco Central del Ecuador. <https://www.bce.ec>

Imanbayeva, M. K., Masalimov, Z. K., Prosekov, A. Y., Milentyeva, I. S., & Sagyndykov, U. Z. (2024). Fermentation conditions of lactobacilli for the production of lactose-free starter culture. *Online Journal of Biological Sciences*, 24(2), 282–294. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2024.282.294> Israeli, Y., & Lahav, E. (2016). Banana. En *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Vol. 3, pp. 363–381). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00072-1>

Jorge, P., Magalhães, A. P., Grainha, T., Alves, D., Sousa, A. M., Lopes, S. P., Pereira, M. O., & Oliveira, R. (2019). Antimicrobial resistance three ways: Healthcare crisis, major concepts, and the relevance of biofilms. *Centre of Biological Engineering*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz115/5532357>

Junior, F. W. R., Chiomento, J. L. T., Suzana-Milan, C. S., Tortelli, B., Camargo, A. F., Mulinari, J., Mossi, A. J., & Treichel, H. (2023). *Trichoderma* uses in agriculture: A multipurpose tool for biological control and plant growth. En *Trichoderma: Taxonomy, Biodiversity and Applications*.

Kain, Z., & MacLaren, J. (2007). Valor de p inferior a 0,05: ¿Qué significa en realidad? *Pediatrics*, 63(3), 118–120. <https://www.elsevier.es/es-revista-pediatrics-10-articulo-valor-pinferior-005-que-13112660>

Lagunas, J., Zavaleta, E., Osada, S., Aranda, S., Luna, I., & Vaquera, H. (2001). *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate

(*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(1), 57–65.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219108>

Liu, K., Ding, H., Yu, Y., & Chen, B. (2019). A cold-adapted chitinase-producing bacterium from Antarctica and its potential in biocontrol of plant pathogenic fungi. *Marine Drugs*, 17(12), 695. <https://doi.org/10.3390/md17120695>

Mamani, A. I. de F., & Filippone, M. P. (2019). Bioinsumos: Componentes claves de una agricultura sostenible. *Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA)*, 38(1). <https://doi.org/0080-2069>

Marcano, I., Díaz-Alcántara, C., Pimentel, R., Vicioso, F., & Antonio, P. (2024). Inhibición de *Mycosphaerella fijiensis* en banano orgánico (*Musa AAA L.*) con la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 11(3), 7–15. <https://doi.org/10.53287/kxys3855fa98o>

Maridueña-Zavala, M. G., Chong-Aguirre, P. A., Freire-Peñaherrera, A., Moreno, A., Reyes-De-Corcuera, J. I., Jiménez-Feijoo, M. I., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2024a). GC-MS metabolite profiling of *Pseudocercospora fijiensis* isolates resistant to thiabendazole. *PLOS ONE*, 19(11), e0313915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0313915>

Maridueña, M. G., Quevedo, A., Aguaguiña, K., Serrano, L., & Sosa del Castillo, (2021). Colección de cultivos microbianos CIBE (CCM-CIBE): Una colección para la investigación. *Bionatura*, 6(1), 1664–1668. <https://doi.org/10.21931/rb/2021.06.01.32>

Martínez, B., Obret, Y., Pérez, S., & Reyes, Y. (2014). Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma spp.* frente a *Sarocladium oryzae* (*Sawada W. Gams & D. Hawksworth*). *Revista de Protección Vegetal*, 29(2), 106–111. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522014000200005&script=sci_abstract

Mejía, J. S. (2022). Evaluación de extracto crudo de *Penicillium sp.* para la inhibición del crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Colletotrichum musae* (Berk. y M.A. Curtis Arx.), agente causal de antracnosis en banano [Tesis de maestría]. Universidad de Santander.

<https://repositorio.udes.edu.co/entities/publication/ec03a5fa-5181-4e6d-a1e2-1b03db9177f1>

Mejía-Sarmiento, J. S. (2022, 28 de julio). Evaluación de extracto crudo de *Penicillium sp.* para la inhibición del crecimiento *in vitro* e *in vivo* de *Colletotrichum musae* (Berk. y M.A. Curtis Arx.), agente causal de antracnosis en banano. Universidad de Santander.

<https://repositorio.udes.edu.co/entities/publication/ec03a5fa-5181-4e6d-a1e2-1b03db9177f1>

Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca. (2024). Ecuador, líder en exportaciones de banano orgánico hacia la Unión Europea. Ministerio de Producción Comercio Exterior Inversiones y Pesca. <https://www.produccion.gob.ec/ecuador-lider-enexportaciones-de-banano-organico-hacia-la-union-europea/>

Moreno, C., Cotes, A., Beltrán, C., Bettioli, W., & Elad, Y. (2018). Control biológico de fitopatógenos del suelo. *Agrosavia.co*, 1, 144–221. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/34059>

Moreno, N. (2016). La agricultura sostenible: Un reto para la microbiología del suelo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVIII (1), 5–6. <https://www.redalyc.org/journal/776/77645907001/html/>

Mousalli-Kayat, G. (2015). Métodos y diseños de investigación cuantitativa. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/303895876_Metodos_y_Disenos_de_Investigacion_Cuantitativa

Mukeshambala, F. F., Ibanda, A. P., Gakuru, J. B. S., Dhed'a, B. D., & Monde, G. K. (2024). Investigating plant extract in inhibition of *Ralstonia solanacearum* responsible for potato wilt. *Journal of Agricultural Science*, 16(9), 95. <https://doi.org/10.5539/jas.v16n9p95>

Noar, R. D., Thomas, E., & Daub, M. E. (2022). Genetic characteristics and metabolic interactions between *Pseudocercospora fijiensis* and banana: Progress toward controlling Black Sigatoka. *Plants*, 11(7), 948. <https://doi.org/10.3390/plants11070948>

Nysanth, N. S., Sivapriya, S. L., Natarajan, C., & Anith, K. N. (2022). Novel *in vitro* methods for simultaneous screening of two antagonistic bacteria against multiple fungal phytopathogens in a single agar plate. *3 Biotech*, 12(6), 140. <https://doi.org/10.1007/s13205022-03205-3>

Ochoa-Jiménez, V. A., Berumen-Varela, G., Balois-Morales, R., Bautista-Rosales, P. U., Chacón-López, M. A., & Gutiérrez-Martínez, P. (2024). Chitosan inhibits the *in vitro* development of *Colletotrichum* sp. from banana (*Musa x paradisiaca* L.) fruits | El quitosano inhibe el desarrollo *in vitro* de *Colletotrichum* sp. en frutos del plátano (*Musa x paradisiaca* L.). *Acta Biologica Colombiana*, 29(2), 56–61. <https://doi.org/10.15446/abc.v29n2.103329>

Orozco, M. (2024). Actualidades en el manejo integrado de Sigatoka negra en banano.

ACORBAT Revista de Tecnología y Ciencia, 1(1). <https://acorbatarc.com/assets/doc/Conferencias/5.%20RTC2481.pdf>

Patry, S. (2021). Omics-based approaches for the identification of novel bioactive secondary metabolites from marine sponge-derived bacterial isolates [Tesis doctoral]. University College Cork. <https://hdl.handle.net/10468/11872>

Pedraza, R., Estrada, G., & Bonilla, R. (2021). Los biofertilizantes y su relación con la sostenibilidad agrícola. *Agrosavia.co*, 1, 32–45. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/36977>

Pérez, R., González, T., & Muñoz, J. (2014, septiembre). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de maíz (*Zea mays*) y jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) del estado de Puebla. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 54–60. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/ab327e9a-34c2-4ccf-90b4-0f9914101a88>

Peralta, J. G. B., Elegado, F. B., Simbahan, J. F., Pajares, I. G., & Dizon, E. I. (2021). Microbial and metabolite profiles of spontaneous and adjunct-inoculated cacao (*Theobroma cacao* L.) fermentation. *Food Research*, 5(2), 331–339. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(2\).526](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(2).526)

Pico Rosado, J., Suárez Palacios, C., Jiménez Cumbicus, J., Paredes Puga, E., Sabando, G., & Andrade Olalla, L. (2024). In vitro evaluation of the inhibitory capacity of three *Trichoderma* isolates on *Ralstonia solanacearum*. *Bionatura Journal*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.21931/RB/2024.09.01.6>

Pope, D. D., & Hill, N. S. (1991). Effects of various culture media, antibiotics, and carbon sources on growth parameters of *Acremonium coenophialum*, the fungal endophyte of tall fescue. *Mycologia*, 83(1), 110–115. <https://doi.org/10.1080/00275514.1991.12025985>

Ramasamy, K. P., Mahawar, L., Rajasabapathy, R., Rajeshwari, K., Miceli, C., & Pucciarelli, S. (2023b). Comprehensive insights on environmental adaptation strategies in Antarctic bacteria and biotechnological applications of cold-adapted molecules. En *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1197797>

Ramos-Veintimilla, M., Zambrano-Gavilanes, F., Solís-Hidalgo, K., Garcés-Fiallos, F. R., Arce, V. Q., & Sánchez-Urdaneta, A. B. (2024). Biological control of *Ralstonia*

solanacearum and its effect on the vegetative growth of organic banana | Controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e seu efeito no crescimento vegetativo da bananeira orgânica | Control biológico de *Ralstonia solanacearum*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 41(2).
[https://doi.org/10.47280/RevFacAgron\(LUZ\).v42.n2.06](https://doi.org/10.47280/RevFacAgron(LUZ).v42.n2.06)

Regalado, J. G., Plaza, A. M., & Sánchez, C. P. (2019). Amenazas de las manchas foliares de Sigatoka, *Mycosphaerella* spp., en la producción sostenible de banano en el Ecuador. *Revista Verde de Agroecología e Desenvolvimento Sustentável*, 14(5), 591–596.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7266829>

Rocha, N., Claros, M., Calisaya, J. J., & Ortuño, N. (2019). Selección de bacterias endófitas tipo *Bacillus* como promotoras de crecimiento en el cultivo de papa variedad Huaycha (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena*). *Revista Latinoamericana de la Papa*, 23(1), 14–34.
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/7349829.pdf>

Rodríguez García, C., James, A., & Orozco Santos, M. (2005). *Revista Mexicana de Fitopatología*.
https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1397/1/id38740_Gilberto_Manzo.pdf

Rodriguez, A., Barnes, C., Salazar, A., Soria, C., & Ordóñez, M. (2017). Identificación y evaluación de algunos hongos con actividad celulásica aislados en Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 33(1–2), 65–81.
<https://doi.org/10.26807/remcb.v33i1-2.224>

Rojas, L. (2024). Los basidiomicetos: Una herramienta biotecnológica promisoriosa con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*, 17(1), 49–55.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209128776009>

Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., Cocolin, L., & Dolci, P. (2019a). Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*, 115, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.002>

Santos, A., Núñez, K., Lamilla, C., Pavez, M., Quezada, D., & Barrientos, L. (2020). Antifungal activity screening of antarctic actinobacteria against phytopathogenic fungi. *Acta Biológica Colombiana*, 25(2), 353–358. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/dcart?info=link&codigo=9770059&orden=0>

Sawyer, S. F. (2009). Analysis of variance: The fundamental concepts. *Journal of Manual & Manipulative Therapy*, 17(2), 27E–38E. <https://doi.org/10.1179/jmt.2009.17.2.27e>

Silva, T. R., Duarte, A. W. F., Passarini, M. R. Z., Ruiz, A. L. T. G., Franco, C. H., Moraes, C. B., de Melo, I. S., Rodrigues, R. A., Fantinatti-Garboggini, F., & Oliveira, V. M. (2018). Bacteria from Antarctic environments: Diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. *Polar Biology*, 41(7), 1505–1519. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2300-y>

The Food Tech. (2024, August 8). Alimentos orgánicos y sostenibles: Regulaciones y oportunidades en la región. *The Food Tech*. <https://thefoodtech.com/normatividad-y-certificaciones/alimentos-organicos-sostenibles-regulaciones-beneficios-tendenciaslatinoamerica/>

Vargas Baquero, C. (2020). Bacterias ácido-lácticas como biocontroladoras de la marchitez vascular ocasionada por *Fusarium oxysporum* y *Ralstonia solanacearum* en tomate [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].

Vázquez, A., Vázquez, A., Ruiz, S., López, G., De Gyves-Córdova, M. G., & Mejía, J. (2022). Capacidad probiótica preliminar de bacterias ácido-lácticas aisladas de diferentes fuentes. *Revista Biociencias*. <https://www.biociencias.unach.mx/ibciencias>

Velez, O. (2021). Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano, métodos de control y manejo: Revisión de literatura. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 15(3), 45–60. <https://bdigital.zamorano.edu/items/814f6846-79b1-44f3-a1b2-4bc70a7760e6>

Vera, M. (2018). Caracterización de microorganismos benéficos provenientes de tres pisos altitudinales de Azuay – Ecuador y su influencia en el cultivo de fresa. Universidad Nacional Agraria La Molina. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/items/13322a03-e87c-4ba4-8832-45ffe5d71ba2>

Viera-Arroyo, W. F., Tello-Torres, C. M., Martínez-Salinas, A. A., Navia-Santillán, D. F., Medina-Rivera, L. A., Delgado-Párraga, A. G., Perdomo-Quispe, C. E., Pincay-Verdezoto, A. K., Báez-Cevallos, F. J., Vásquez-Castillo, W. A., & Jackson, T. (2020). Control biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128–149. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592020000200006

Villegas-Escobar, V., González-Jaramillo, L. M., Ramírez, M., Moncada, R. N., Sierra-Zapata, L., Orduz, S., & Romero-Tabarez, M. (2018). Lipopeptides from *Bacillus* sp. EACB0959: Active metabolites responsible for in vitro and in vivo control of *Ralstonia solanacearum*. *Biological Control*, 125, 20–28. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2018.06.005>

Yong, S. T., Peng-Teoh, C., Lavin, P. L., González, M. A., & Vui Ling Wong, C. M. (2024). Antarctic spore-forming microorganisms from Deception Island inhibit the growth of

various bacterial strains. *Sains Malaysiana*, 53(7), 1559–1574.
<https://doi.org/10.17576/jsm2024-5307-07>

Wolf, D., Aggarwal, M., Battalora, M., Backler, A., Catalano, S., Cazarin, K., Lautenschlaeger, D., Pais, M., Rodríguez, M., Rupprecht, K., Mehta, J., & Serex, T. (2020, February 12). Rethinking agrochemical safety assessment: A perspective. *Society of Chemical Industry*, 127, 105068. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105068>

Zapata, Y., Cotes, A., Jijakli, H., & Wisniewski, M. (2018). Control biológico de patógenos foliares. *Agrosavia.co*, 1, 56–143. [https://doi.org/978-958-740-253-7%20\(e-book\)](https://doi.org/978-958-740-253-7%20(e-book))

Zepeda, A. (2015). *Aeromonas* spp.: La infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México. *AquaTIC*, 1, 1–16.
<https://www.redalyc.org/pdf/494/49444322001.pdf>

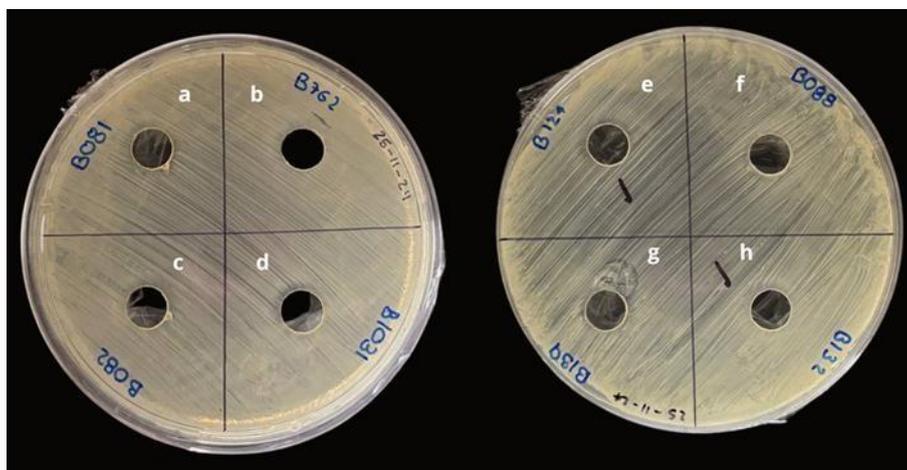
Zaquicela, P., Romanova, E., Guamán, R., Ulloa, S., & Villavicencio, A. (2025). Caracterización morfológica y bioquímica de *Ralstonia solanacearum* Raza 2, bacteria patógena en cultivos de banano y plátano en El Carmen, Manabí, Ecuador. *Revista Digital Siembra*, 1. <https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/SIEMBRA/article/view/4305/5355>

Zhu, L., Qiu, H., Xiang, H., Liu, H., Shi, Y., & Yuan, Y. (2024). Identification, antimicrobial activity, and optimization of fermentation medium of endophytic bacterium strain ZL34 from *Carya cathayensis*. *Chinese Journal of Biological Control*.

Anexos

Anexo 1. Selección preliminar de cepas bacterianas antárticas contra *R. Solanacearum*.

Procedencia	Cepa	Efecto inhibitorio	
		Positivo (+)	Negativo (-)
	<i>Arthobacter livingstonensis</i>) x x
	<i>Arthobacter</i> sp.		
	<i>Chryseobacterium</i> sp.	x x	
	<i>Filibacter</i> sp		x x
	<i>Janthinobacterium lividium</i>		
	<i>Janthinobacterium tructae</i>	x	x
	<i>Leifsonia antarctica</i>		
	<i>Pseudomonas antarctica</i>	x	x
	<i>Pseudomonas brenneri</i>		
	<i>Pseudomonas caspiana</i>	x x	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		x
	<i>Pseudomonas frederickbergensis</i>		
Suelo Antártico	<i>Janthinobacterium</i> sp		
	<i>Pseudomona rhodesiae</i>	x	
	<i>Pseudomonas</i> sp.		x
	<i>Pseudomonas yamanorum</i>		x
	<i>Psychrobacter glacincola</i>	x	
	<i>Ralstonia pickettii</i>		x
	<i>Rhodoccus</i> sp		x
	<i>Streptomyces nojiriensis</i>		x
	<i>Streptomyces</i> sp		x
	<i>Pseudomonas kitaguniensis</i>	x	
	<i>Pseudomonas paraversuta</i>		x
	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	x	
	<i>Pseudomonas silesiensis</i>		x

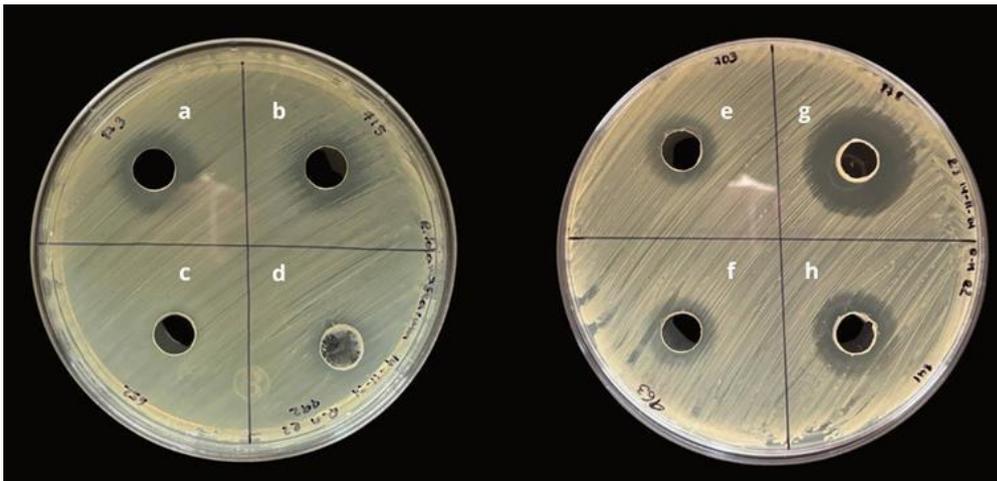


Anexo 2. Confrontación preliminar de bacterias antárticas contra *R. solanacearum* en placa Petri. (a) *Pseudomonas yamanorum*, (b) *Arthobacter livingstonensis*, (c) *Pseudomonas paraversuta*, (d) *Pseudomonas caspiana*, (e) *Pseudomonas rhodesiae* (f) *Pseudomonas silesiensis*, (g) *Pseudomonas* sp., (h) *Filibacter* sp.

Anexo 3. Selección preliminar de cepas bacterianas fermentados de cacao contra *R. Solanacearum*

Procedencia	Cepa	Efecto inhibitorio	
		Positivo (+)	Negativo (-)
	<i>Acetobacter ghanensis</i>	x	
	<i>Acetobacter papayae</i>	x	
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	x	
	<i>Bacillus altitudinis</i>	x	
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	x	
	<i>Bacillus cereus</i>	x	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	x	
Fermentados de cacao	<i>Bacillus siamensis</i>	x	
	<i>Bacillus</i> sp.	x	

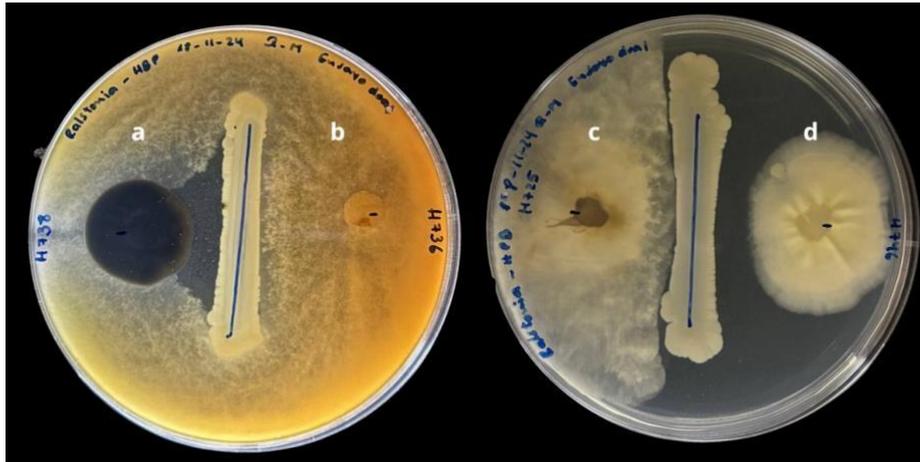
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	X	
<i>Priestia megaterium</i>		X
<i>Acetobacter oryzoeni</i>	X	
<i>Bacillus paramycooides</i>		X
<hr/>		
<i>Acetobacter tropicalis</i>	X	
<i>Staphylococcus capitis</i>	X	
<i>Bacillus Subtilis</i>		X
<i>Paenibacillus vulneris</i>	X	
<i>Paenibacillus acanthi</i>	X	
<i>Liquoribacillus mali</i>	X	
<i>Brevibacillus formosus</i>	X	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	X	
<i>Levilactobacillus brevis</i>	X	
<i>Acetobacter sp.</i>	X	
<i>Bacillus velezensis</i>	X	
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>		X
<i>Leuconostoc pseudonomesenteroides</i>		X
<i>Paenibacillus yunnansis</i>		X
<i>Ralstonia sp.</i>	X	
<i>Sphingomonas panni</i>	X	
<i>Staphylococcus epidermis</i>		X



Anexo 4. Confrontación preliminar de bacterias fermentadas de cacao contra *R. solanacearum* en placa Petri. (a) *Paenibacillus vulneris*, (b) *Acetobacter tropicalis*, (c) *Bacillus Subtilis*, (d) *Staphylococcus capitis*, (e) *Bacillus* sp. (f) *Staphylococcus capitis*, (g) *Bacillus siamensis*, (h) *Bacillus licheniformis*. Se observa con detalle la formación de halos de inhibición a las 48 horas de ensayo.

Anexo 5. Selección preliminar de hongos filamentosos del Bosque protector Prosperina contra *R. Solanacearum*.

Procedencia	Cepa	Efecto inhibitorio	
		Positivo (+)	Negativo (-)
Hongos Bosque protector	<i>Talaromyces liani</i>		X
	<i>Trichoderma inhamatum</i>	X	
	<i>Absidia</i> sp.		X
	<i>Trichoderma spirale</i>	X	
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		X
	<i>Gongronella butleri</i>		X

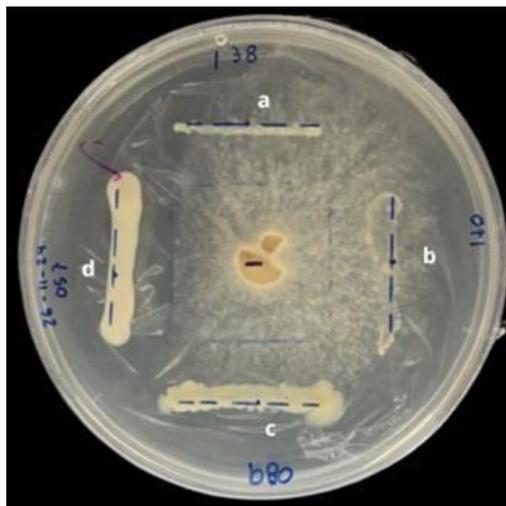


Anexo 6. Confrontación dual de hongos del Bosque protector Prosperina contra *R. solanacearum* en placa Petri durante el quinto de ensayo. (a) *Cladosporium cladosporioides*, (b) *Trichoderma spirale*, (c) *Absidia* sp., (d) *Gongronella butleri*.

Anexo 7. Selección preliminar de cepas bacterianas antárticas contra *C. musae*.

Procedencia	Cepa	Efecto inhibitorio
-------------	------	--------------------

	Positivo (+)	Negativo (-)
<i>Arthobacter livingstonensis</i>) x x
<i>Arthobacter</i> sp.		x
<i>Chryseobacterium</i> sp.	x	
<i>Filibacter</i> sp.		x x
<i>Janthinobacterium lividium</i>		x x
<i>Janthinobacterium tructae</i>	x x	x
<i>Leifsonia antartica</i>	x	
<i>Pseudomonas antartica</i>		
<i>Pseudomonas brenneri</i>	x x	x
<i>Pseudomonas caspiana</i>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
<i>Pseudomonas frederickbergensis</i>		
<i>Janthinobacterium</i> sp.		
<i>Pseudomona rhodesiae</i>		
<i>Pseudomonas</i> sp.		
Suelo Antártico		
<i>Pseudomonas yamanorum</i>	x	x
<i>Psychrobacter glacincola</i>		x
<i>Ralstonia pickettii</i>		x
<i>Rhodoccus</i> sp.		x
<i>Streptomyces nojiriensis</i>	x	
<i>Streptomyces</i> sp. <i>Pseudomonas kitaguniensis</i>	x	
<i>Pseudomonas paraversuta</i>		x
<i>Pseudomonas psychrophila</i>		x
<i>Pseudomonas silesiensis</i>		x
<i>Pseudomona numensis</i>		x

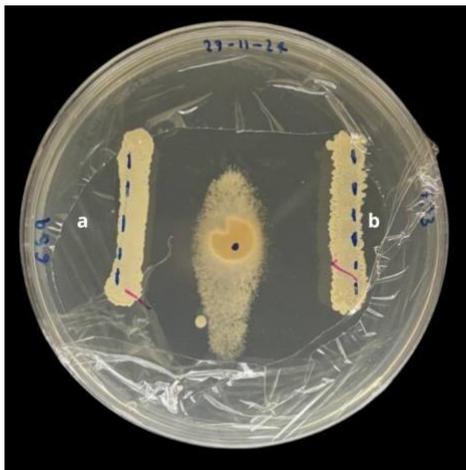


Anexo 8. Enfrentamiento preliminar en placa Petri situando a *C. musae* en el centro frente a cepas antárticas en el cuarto día de incubación. (a) *Leifsonia antarctica*, (b) *Psychrobacter glacincola*, (c) *Pseudomona numensis* y (d) *Pseudomonas frederickbergensis*. Se logra observar recubrimiento micelial por parte del patógeno sobre *Leifsonia antarctica*, *Psychrobacter glacincola* y *Pseudomona numensis* mientras que existe respuesta por parte de *Pseudomonas frederickbergensis*.

Anexo 9. Selección preliminar de cepas bacterianas fermentadas de cacao contra *C. musae*.

Procedencia	Cepa	Efecto inhibitorio	
		Positivo (+)	Negativo (-)
	<i>Acetobacter ghanensis</i>		X
	<i>Acetobacter papayae</i>		X
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>		X
	<i>Bacillus altitudinis</i>		X
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		X
	<i>Bacillus cereus</i>		X
	<i>Bacillus licheniformis</i>		X
Fermentados de cacao	<i>Bacillus siamensis</i>		X

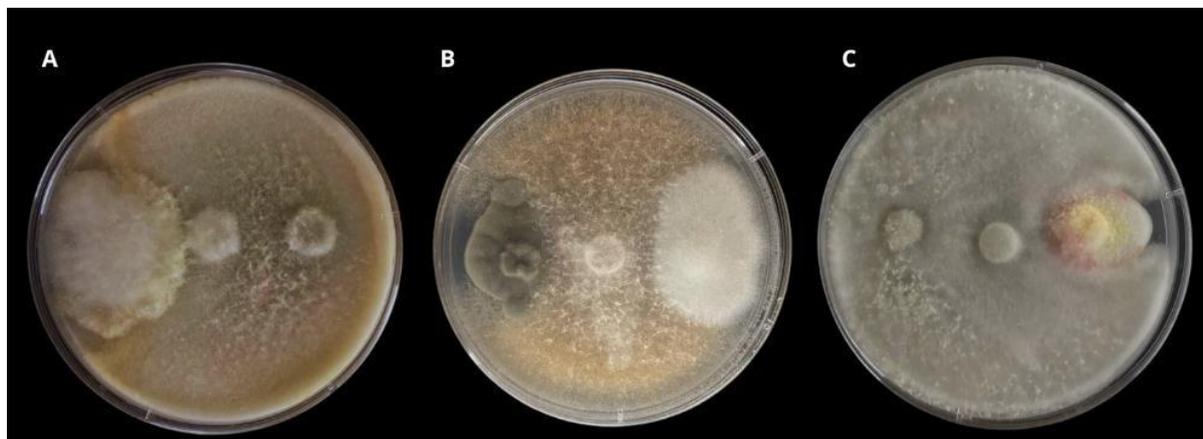
<i>Bacillus</i> sp.	x	
<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>	x	
<hr/>		
<i>Priestia megaterium</i>		x
<i>Acetobacter oryzoeni</i>		x
<i>Bacillus paramycoides</i>		x
<i>Acetobacter tropicalis</i>		x
<i>Staphylococcus capitis</i>		x
<i>Bacillus Subtilis</i>		x
<i>Paenibacillus vulneris</i>		x
<i>Paenibacillus acanthi</i>		x
<i>Liquoribacillus mali</i>		x
<i>Brevibacillus formous</i>		x
<i>Lactobacillus plantarum</i>		x
<i>Levilactobacillus brevis</i>		x
<i>Acetobacter</i> sp.		x
<i>Bacillus velezensis</i>		x
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	x	x
<i>Leuconostoc pseudonomesenteroides</i>		x
<i>Paenibacillus yunnansis</i>		x
<i>Ralstonia</i> sp.		x
<i>Sphingomonas panni</i>		x
<i>Staphylococcus epidermis</i>		x



Anexo 10. Confrontación dual de bacterias fermentados de cacao contra *C. musae* situado en el centro de la placa Petri durante el cuarto día de incubación. (a) *Priestia megaterium* y (b) *Bacillus amyloliquefaciens*.

Anexo 11. Selección preliminar de hongos filamentosos del Bosque protector Prosperina contra *C. musae*.

Procedencia	Cepa	Efecto inhibitorio	
		Positivo (+)	Negativo (-)
Hongos Bosque protector	<i>Talaromyces liani</i>		X
	<i>Trichoderma inhamatum</i>	X	
	<i>Absidia sp.</i>		X X
	<i>Trichoderma spirale</i>		
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		X
	<i>Gongronella butleri</i>		X



Anexo 12. Enfrentamiento preliminar en placa Petri situando a *C. musae* en el centro (A) En el lado izquierdo *Absidia* sp. y lado derecho *Trichoderma spirale*, (B) En el lado izquierdo *Cladosporium cladosporioides* lado derecho *Gongronella butleri* (C) En el lado izquierdo *Trichoderma inhamantum* lado derecho *Talaromyces liani* en el sexto día de incubación.

Anexo 13. Cepas microbianas de la colección de cultivos microbianos (CIBE).

Bacterias de la fermentación de cacao	
CCMCIBE-B683	<i>Acetobacter ghanensis</i>
CCMCIBE-B681	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
CCMCIBE-B972	<i>Bacillus altitudinis</i>
CCMCIBE-B841	<i>Bacillus licheniformis</i>
CCMCIBE-B963	<i>Bacillus cereus</i>
CCMCIBE-B753	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
CCMCIBE-B915	<i>Brevibacillus formosus</i>
CCMCIBE-B866	<i>Liquoribacillus mali</i>
CCMCIBE-B857	<i>Leuconostoc pseudonomesenteroides</i>
CCMCIBE-B869	<i>Bacillus velezensis</i>
CCMCIBE-B997	<i>Levilactobacillus brevis</i>
CCMCIBE-B992	<i>Staphylococcus capitis</i>
CCMCIBE-B873	<i>Paenibacillus vulneris</i>
CCMCIBE-B872	<i>Lactobacillus plantarum</i>
CCMCIBE-B722	<i>Paenibacillus yunnansis</i>
CCMCIBE-B700	<i>Ralstonia</i> sp.
CCMCIBE-B682	<i>Sphingomonas panni</i>
CCMCIBE-B689	<i>Acetobacter</i> sp.
CCMCIBE-B864	<i>Staphylococcus epidermis</i>
CCMCIBE-B859	<i>Paenibacillus acanthi</i>
CCMCIBE-B670	<i>Acetobacter oryzoeni</i>
CCMCIBE-B660	<i>Bacillus paramycoides</i>
CCMCIBE-B652	<i>Bacillus Subtilis</i>
CCMCIBE-B715	<i>Acetobacter tropicalis</i>
CCMCIBE-B659	<i>Priestia megaterium</i>
CCMCIBE-B952	<i>Lactiplantibacillus fabifermentans</i>
CCMCIBE-B878	<i>Bacillus siamensis</i>
CCMCIBE-B703	<i>Bacillus</i> sp.
CCMCIBE-B953	<i>Acetobacter papayae</i>
CCMCIBE-B858	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Bacterias provenientes de suelo antártico	
CCMCIBE-B762	<i>Arthobacter livingstonensis</i>
CCMCIBE-B051	<i>Arthobacter</i> sp.

CCMCIBE-B775	<i>Chryseobacterium</i> sp.
CCMCIBE-B132	<i>Filibacter</i> sp.
CCMCIBE-B006	<i>Janthinobacterium lividium</i>
CCMCIBE-B095	<i>Janthinobacterium tractae</i>
CCMCIBE-B138	<i>Leifsonia antarctica</i>
CCMCIBE-B135	<i>Pseudomonas antarctica</i>
Hongos provenientes del Bosque Protector Prosperina	
CCMCIBE-H721	<i>Talaromyces liani</i>
CCMCIBE-H722	<i>Trichoderma inhamatum</i>
CCMCIBE-H725	<i>Absidia</i> sp.
CCMCIBE-H736	<i>Trichoderma spirale</i>
CCMCIBE-H738	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
CCMCIBE-H746	<i>Gongronella butleri</i>
Microorganismos Patógenos	
CCMCIBE-H665	<i>Colletotrichum musae</i>
CCMCIBE-H629	<i>Pseudocercospora fijiensis</i>
CCMCIBE-B1290	<i>Ralstonia solanacearum</i>