



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

Facultad de Ciencias de la Vida

" Estudio comparativo de la eficacia de microorganismos en el control *de Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* como agente causal de la Fusariosis del banano"

Proyecto de titulación

Previo a la obtención del Título de:

Magister En Biociencias Aplicadas Con Mención En Biodescubrimiento

Presentado por: Karen Eliana Muñoz Mawyin

Guayaquil – Ecuador, 2025

Dedicatoria

Este proyecto lo dedico especialmente a mis padres, Elías Muñoz y Patricia Mawyin, por el tiempo y dinero invertido en mí para que pueda cumplir con los objetivos que me he planteado. Su apoyo constante ha permitido la culminación de este trabajo. Así también a mis hermanos, Elías Muñoz y Patricia Muñoz, y a mi pareja, Isaías Mejía, quienes me supieron dar ánimos durante toda esta etapa

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Ing. Andrés Astudillo y a la MSc. Lorena Monserrate por el apoyo constante brindado durante la ejecución del proyecto. De igual manera, a la MSc. Lizette Serrano, MSc. Adela Quevedo y la Ing. Estefany Paredes por su ayuda en los montajes exhaustivos del proyecto.

Agradezco sinceramente al PhD. Freddy Magdama, al PhD. Eduardo Chica, a la MSc. Lorena Monserrate y a la PhD. Daynet Sosa quienes fueron mis guías en la ejecución del proyecto. Sus sugerencias tanto en la ejecución del proyecto como en la escritura fueron valiosas.

Por último, me es muy grato y me llena de orgullo agradecer a mi familia y a mi pareja por su constante apoyo, ánimos y paciencia.

Declaración Expresa

Yo, Karen Eliana Muñoz Mawyin, acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 19 de marzo del 2025.

Karen Eliana Muñoz Mawyin

Autor

Tribunal de graduación

María Isabel Jiménez Feijoo

Presidente

Freddy Arturo Magdama Tobar, Ph.D.

Tutor

Eduardo José Chica Martínez, Ph.D.

Cotutor

Daynet Sosa del Castillo, Ph.D.

Evaluada 1

M.Sc. Bertha Lorena Monserrate Maggi.

Evaluada 2

Resumen

La afectación de plantaciones de banano a causa del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (*Foc*TR4), agente causal de la Fusariosis del banano, es un riesgo latente para Ecuador, país catalogado como principal exportador de banano a nivel mundial. La presencia de microorganismos benéficos en el suelo puede ayudar a reducir la incidencia y severidad de la enfermedad al reducir la carga de esporas en el suelo y mejorar la respuesta de resistencia de las plantas. Este estudio seleccionó cepas con actividad inhibitoria a partir de dos colecciones de microorganismos procedentes de: (1) Enmiendas Orgánicas Líquidas (EOL) de la provincia del Guayas, y (2) del suelo, rizosfera y pseudotallo de banano de la provincia de Bolívar. Se realizaron ensayos *in vitro*, que incluyó, enfrentamientos de cepas, evaluación de metabolitos, y supresión de inóculo en suelo, además, se realizaron ensayos de patogenicidad. Los ensayos ejecutados permitieron la selección de cepas según su capacidad de inhibición a *Foc*. Las cepas promisorias, con mayor capacidad antagonista frente a *Foc*R1, pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. Sin embargo, las cepas de *Bacillus* fueron las que mejor controlaron la enfermedad en los ensayos de patogenicidad. En conclusión, cepas de *Bacillus* sp., aisladas de enmiendas orgánicas, tienen la capacidad de reducir la incidencia y severidad de Fusariosis en plantas de banano.

Palabras clave: Biocontrol, microorganismos benéficos, ensayos de patogenicidad.

Abstract

The impact of Fusarium oxysporum f. sp. cubense tropical race 4 (FocTR4), the causal agent of Fusarium wilt of banana, poses a significant risk to Ecuador, the world's main banana exporter. The presence of beneficial microorganisms in the soil can mitigate the incidence and severity of the disease by reducing the spore load and enhancing the plant's resistance response. This study aimed to identify microbial strains with inhibitory activity against FocTR4 from two distinct microorganism collections: (1) Liquid Organic Amendments from the province of Guayas and (2) soil, rhizosphere, and pseudostem samples from banana plantations in the province of Bolivar. In vitro assays, including strain confrontation, metabolite evaluation, and inoculum suppression in soil, were conducted, along with pathogenicity tests. These assays facilitated the selection of strains based on their inhibitory capacity against Foc. The most promising strains, exhibiting the highest antagonistic activity against Foc race 1 (FocR1), belong to the genera Bacillus, Pseudomonas, and Stenotrophomonas. However, Bacillus strains demonstrated the highest efficacy in controlling the disease in pathogenicity assays. In conclusion, Bacillus spp. strains isolated from organic amendments exhibit the potential to reduce the incidence and severity of Fusarium wilt in banana plants.

Keywords: *Biocontrol, Beneficial microorganisms, Pathogenicity assays.*

Índice General

CAPÍTULO 1	1
1 Introducción y objetivos	1
1.1 Antecedentes y justificación	1
1.2 Objetivo general	2
1.3 Objetivos específicos	2
1.4 Marco Teórico	3
1.4.1 La importancia del banano.....	3
1.4.2 Fusariosis, enfermedad del banano.	3
1.4.3 Investigaciones para la supresión de la Fusariosis en banano.	5
CAPÍTULO 2	8
2 Metodología	8
2.1 Cepas evaluadas.....	8
2.2 Ensayos in vitro	10
2.2.1 Ensayo de enfrentamiento.	10
2.2.2 Ensayo de difusión en pozo de agar.	11
2.2.3 Identificación molecular de cepas promisorias.....	13
2.2.4 Evaluación en condiciones de suelo para la supresión de esporas.	14
2.3 Ensayo de patogenicidad	15
2.3.1 Análisis del rizoma.	17
2.3.2 Postulados de Koch.	18
2.4 Análisis estadísticos	19
3 Resultados.....	20

3.1	<i>Ensayo de enfrentamiento bacteriano contra FocRI</i>	20
3.2	<i>Ensayo de enfrentamiento fúngico contra FocRI</i>	20
3.3	<i>Ensayo de difusión en pozo de agar</i>	22
3.4	<i>Identificación molecular de las cepas promisorias</i>	23
3.5	<i>Evaluación en condiciones de suelo simuladas</i>	25
3.6	<i>Ensayo de patogenicidad</i>	26
3.6.1	Postulados de Koch.	27
4	Discusiones	28
5	Conclusiones y recomendaciones	32
6	Bibliografía	34

ABREVIATURAS

16S rRNA: 16S ribosomal RNA

BE: Efecto de biocontrol

DI: Incidencia

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

EOL: Enmiendas Orgánicas Líquidas

f. sp.: *formae specialis*

Foc: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

FocR1: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

FocSTR4: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 subtropical

FocTR4: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical

ITS: Internal Transcribed Spacer

LAC: América Latina y el Caribe

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PDA: Agar papa dextrosa

PDI: Severidad

PIB: Producto Interno Bruto

PIR: Porcentaje de Inhibición Radial

SIX9: Secreted in xylem 9

TSA: Agar tripticasa soya

VGG: Grupos de Compatibilidad Vegetativa

Índice de Figuras

Figura 1 Gráfico representativo de la siembra de FocR1 y cepas bacterianas en el ensayo de enfrentamiento	10
Figura 2 Gráfico representativo de la siembra de FocR1 y cepas fúngicas en el ensayo de enfrentamiento	11
Figura 3 Gráfico representativo de la placa del ensayo de difusión en agar, en donde en los huecos (A, B, C, D) se agrega el sobrenadante de los microorganismos evaluados. Mientras que, en toda el área de la placa se siembra los conidios de FocR1.....	12
Figura 4 Incubación de las placas de la evaluación en condiciones de suelo simuladas.	15
Figura 5 Escala de Fusariosis presentada en los rizomas de plantas Gros Michel.	18
Figura 6 Porcentaje de inhibición de los microorganismos frente a FocR1. A) cepas bacterianas. B) cepas fúngicas.	21
Figura 7 Ensayo de evaluación de metabolitos. A) Cantidad de microorganismos por cada variable cualitativa en el ensayo de difusión en pozo de agar. B) Escala cualitativa.	23
Figura 8 Árbol filogenético de las cepas que cumplieron el criterio de evaluación del ensayo de difusión en pozo de agar. Las cepas pertenecientes al ensayo tienen colocados un cuadrado (◻) del lado derecho de su código.....	24
Figura 9 Confirmación del patógeno (FocR1) en base a los Postulados de Koch del ensayo in vivo. A) La posición 1 es el marcador molecular 100bp, los pocillos 2-9 son amplicones de ITS de diferentes aislados, el pocillo 10 es blanco de ITS, el pocillo 11-18 son amplicones de SIX9 de las muestras correspondientes y el pocillo 19 es blanco de SIX9. B) Uno de los aislado del rizoma, perteneciente al tratamiento 7 réplica 10.....	27

Índice de tablas

Tabla 1 Resumen de información de los microorganismos evaluados frente a FocR1. EOL: microorganismos obtenidos de enmiendas orgánicas líquidas; Banano: microorganismos obtenidos de suelo, rizosfera y pseudotallo de banano de plantaciones bananeras	9
Tabla 2 Escala de evaluación para el ensayo de difusión en pozo de agar.	13
Tabla 3 Tratamientos evaluados en el ensayos in vivo en plantas de banano variedad Gros Michel en maceta	16
Tabla 4 Respuesta de la interacción de cepas bacterianas en condiciones de suelo simuladas en el conteo de UFC de Foc luego de 30 días de co-incubación. C+: Control Positivo; C-: Control Negativo	25
Tabla 5 Respuesta de tratamientos en la incidencia, severidad y biocontrol contra la Fusariosis del banano variedad Gros Michel. DI: Incidencia; PDI: Severidad; BE: Efecto de biocontrol sobre Foc	26
Tabla 6 Porcentaje de inhibición de FocR1 ocasionado por las cepas fúngicas evaluadas originarias del grupo Banano	50
Tabla 7 Porcentaje de inhibición de FocR1 ocasionado por las cepas fúngicas evaluadas originarias del EOL	52
Tabla 8 Porcentaje de inhibición de FocR1 ocasionado por las cepas bacterianas evaluadas originarias del EOL	55
Tabla 9 Datos de la Fusariosis de cada planta evaluada en el ensayo in vivo obtenido mediante ImageJ. Transformado: ASENS (RAIZ(Promedio /100)).....	59
Tabla 10 Fotos del rizoma de los tratamientos y controles evaluados	63
Tabla 11 Análisis del porcentaje de área necrosada del rizoma utilizando la herramienta ImageJ	67

CAPÍTULO 1

1 Introducción y objetivos

1.1 Antecedentes y justificación

En el siglo XX, pérdidas de plantaciones enteras de banano variedad Gros Michel en América y las islas del Caribe, fueron ocasionadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) raza 1, agente causal de la Fusariosis del banano; sin embargo, la producción y exportación de banano fue controlada debido a la inserción de la variedad de banano Cavendish (Pegg & Langdon, 1987; Ploetz, 2015). En los años 1960s, se observaron afectaciones en las plantaciones Cavendish en Taiwán con sintomatología de Fusariosis asociado al VCG01213 e identificado como *Foc* raza 4 tropical (*Foc*TR4) (EFSA Panel on Plant Health (PLH) et al., 2022). A pesar de los intentos de confinamiento de *Foc*TR4, éste se ha ido diseminando a otras regiones de Asia, Oceanía, África y América (EPPO Global Database, 2024).

En la actualidad, Ecuador es el principal exportador de bananos Cavendish a nivel mundial representando cerca del 35% del Producto Interno Bruto (PIB) agrícola (Ajila et al., 2023; *BANANO – Agrocalidad*, s. f.), siendo la región Costa, la principal zona donde se cultiva el banano (Mosquera et al., 2023). Esta producción se encuentra en riesgo latente debido a los reportes de *Foc*TR4 en países cercanos como Colombia (García-Bastidas et al., 2020), Perú (Acuña et al., 2022) y Venezuela (Mejías Herrera et al., 2023).

A fin de mitigar el impacto ocasionado por *Foc*, a nivel global se están realizando diversas investigaciones enfocadas al desarrollo de variedades de banano resistentes (Jankowicz-Cieslak et al., 2022; X. Wang et al., 2021), análisis ómicos (Anuradha et al., 2024; Dong et al., 2020; S. Li et al., 2022), la aplicación de agentes de biocontrol (Huang et al., 2022), uso de desinfectantes (Nguyen et al., 2019), y, la búsqueda y desarrollo de nuevos fungicidas (Cannon et al., 2022; Nel et al., 2007).

En la actualidad, no existe variedad resistente comercial, ni producto químico que pueda erradicar a *Foc*. Por ello, el uso de microorganismos locales, para mitigar su incursión y establecimiento, representa una alternativa viable. El presente estudio evalúa cepas de microorganismos locales con actividad antagonista frente a *FocR1* en ensayos *in vitro* e *in vivo* que puedan servir para planes de manejo frente a una eventual incursión de *FocR4T*.

1.2 Objetivo general

Evaluar la eficacia de microorganismos aislados de enmiendas orgánicas líquidas, y de suelo, rizosfera y pseudotallo de banano Gros Michel, en la inhibición de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

1.3 Objetivos específicos

Identificar cepas de bacterias y hongos con potencial inhibidor del crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* mediante pruebas comparativas de antagonismo *in vitro*.

Caracterizar cepas de bacterias y hongos que inhiban a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* mediante marcadores moleculares.

Analizar el efecto de cepas promisorias en la reducción de unidades formadoras de colonias de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* en suelo.

Evaluar el potencial de control de cepas seleccionadas sobre la incidencia y severidad de Fusariosis en plantas de banano variedad Gros Michel en condiciones de invernadero.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 La importancia del banano.

El banano es considerado como un alimento básico, con un consumo anual de 400 a 600 kg por persona en la región de África del Este (Westerhoven et al., 2022). En el 2021, Papúa Nueva Guinea y Ruanda tuvieron un consumo per capita superior a 100 kg anuales; Comoras y Laos, más de 80 kg anuales; Burundi y Guatemala más de 60 kg anuales; Perú y República Dominicana, más de 40 kg anuales; y, Tanzania, Angola, Kenia, Camerún, Indonesia, Bahamas y Brasil con un consumo superior a 20 kg per capita anual (Helgi Library, 2021). El banano se cultiva en las regiones del trópico y subtrópico, siendo India el principal país productor, seguido de China, Indonesia, Brasil, Ecuador, Filipinas y Guatemala (Mostafa, 2021).

El banano es un alimento básico que contiene un alto valor nutricional al ser fuente de proteínas, lípidos, fibra, azúcar, vitaminas y minerales. Además, estudios recientes han explorado su uso en la industria alimentaria como sustituto de la harina (Mostafa, 2021), antioxidantes naturales (Sunati & Purnomo, 2019), fuente de fibra dietética (Bin Mohd Zaini et al., 2019), fuente de prebióticos (Costa et al., 2017), sustituto de grasas (Pereira et al., 2020), sustituto de sucrosa (Oliveira de Souza et al., 2018) y saborizante (Da Silva et al., 2017; Mostafa, 2021). Asimismo, su valor se destaca en otras industrias, al ser usado como fuente de celulosa nanocompuesta (Pelissari et al., 2017), nanofibra de celulosa (Pandurangan & Kanny, 2020; Pelissari et al., 2014), nanopartículas de plata (Mostafa, 2021; Tibolla et al., 2018), entre otros.

1.4.2 Fusariosis, enfermedad del banano.

Los cultivos de banano son susceptibles a diferentes patógenos, de los cuales destaca *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), agente causal de la Fusariosis del banano o también conocida como Mal de Panamá (Tinzaara et al., 2024). La primera vez que se reportó la Fusariosis del banano fue en 1874 en Australia por el Dr. Joseph Bancroft, quien observó

sintomatología en plantas de banano de la variedad *Silk* (Pegg et al., 2019). La sintomatología de la Fusariosis se puede desarrollar en diferentes partes de la planta, destacándose la marchitez, el amarillamiento, y la decoloración interna de la planta (Garcia-Bastidas, 2022).

La diversidad genética de *Foc* permite clasificar al patógeno en 24 grupos de compatibilidad vegetativa (VCG, por sus siglas en inglés) hasta el momento. Las variedades de banano como Gros Michel, Pisang Awak, Silk, Pome, entre otras son susceptibles a los VCG0120, VCG0121, VCG0122, VCG0124 y VCG0125, quienes están asociados a *Foc* raza 1 (*FocR1*) (Chen et al., 2019; Puhalla, 1985). Mientras que, la variedad Cavendish, quien es la principalmente exportada a nivel global es susceptible a VCG01213/16, grupo asociado a *Foc* raza tropical 4 (*FocTR4*). *FocTR4* afecta más del 60% de todas las variedades que se cultivan (Dita et al., 2018; Guo et al., 2015).

La Fusariosis del banano ocasionada por *FocR1* generó preocupación a nivel mundial entre los años 1950-1960 debido a que afectó gravemente las plantaciones de la variedad Gros Michel, provocando pérdidas estimadas en más de US \$2 300 millones (Dita Rodríguez et al., 2013). La única solución viable a estas pérdidas fue el reemplazo de la variedad Gros Michel por la variedad Cavendish, debido a su resistencia a este patógeno y su rendimiento en producción (Dita Rodríguez et al., 2013).

En Ecuador, la producción de banano con la variedad Cavendish comenzó en 1955, y en 1965 se adoptó de forma masiva (Larrea Maldonado, 1987) siendo hoy en día la variedad líder en las exportaciones bananeras del país (Veliz et al., 2022).

Desde finales de 1960, *FocTR4* emergió como una nueva amenaza significativa para los países productores de banano Cavendish por su agresividad y capacidad destructiva. A pesar de los intentos de contención del patógeno, *FocR4T* ha ocasionado grandes pérdidas de plantaciones de banano Cavendish en países como Taiwán, Indonesia, Malasia y Australia (Garcia-Bastidas, 2022; Molina et al., 2009).

Actualmente, este fitopatógeno se encuentra reportado en países de África, Asia, Oceanía, y América (García-Bastidas, 2022). En América, se reportó por primera vez en 2019 en el país de Colombia (García-Bastidas et al., 2020), luego en Perú en el año 2021 (Acuña et al., 2022) y recientemente (2022) en Venezuela (Mejías Herrera et al., 2023). Su presencia en Latinoamérica y el Caribe (LAC) incrementa el riesgo de incursión a Ecuador.

Dado que el Ecuador es el principal exportador de banano Cavendish a nivel mundial, con alrededor de 300 millones de cajas de banano exportadas anualmente, este patógeno (*FocTR4*) representa una amenaza crítica para toda la cadena productiva, con el potencial de afectar gravemente la economía local y la seguridad alimentaria (*Informe sector bananero*, 2023).

1.4.3 Investigaciones para la supresión de la Fusariosis en banano.

A nivel mundial se realizan diversos ensayos con diferentes enfoques de investigación para suprimir la Fusariosis del banano como: estudios de mejoramiento genético y resistencia de cultivares (Chen et al., 2023; X. Wang et al., 2021), los análisis ómicos (Chang et al., 2020; W.-M. Li et al., 2020; Sun et al., 2022), el biocontrol y el uso de microorganismos benéficos (Hernández-Melchor et al., 2022; S. Li et al., 2022; Mon et al., 2021; Sun et al., 2022; Vargas Perez et al., 2024), entre otras alternativas.

1.4.3.1 Mejoramiento genético y resistencia de cultivares.

El mejoramiento genético y la resistencia de cultivares se centra en la identificación y el desarrollo de plantas de banano resistentes a *Foc*, las cuales pueden obtenerse por mutaciones aleatorias o mutaciones puntuales (Kashtwari et al., 2022).

Las mutaciones aleatorias se inducen a través de metodologías como la mutagénesis por radiación y mutagénesis química, las cuales generan una amplia variedad de mutaciones, deleciones e inserciones durante la replicación del ADN. Estas variaciones genéticas permiten identificar posibles variantes que puedan ser adaptadas en la producción comercial y a su vez, presenten resistencia a *FocTR4* (Kashtwari et al., 2022).

Dado que estas mutaciones son aleatorias, se requiere una gran cantidad de plantas mutantes para obtener alguna que pueda ser candidata, lo que implica un proceso que requiere una inversión significativa de tiempo (González et al., 2024). Actualmente, varios institutos están trabajando en el desarrollo de variedades de banano resistentes. Uno de ellos es el Instituto de Investigación del Banano en Taiwán (TBRI- por sus siglas en inglés), que ha logrado, mediante variación somaclonal, desarrollar variedades con diversos grados de resistencia parcial a *Foc*TR4. Entre las variedades se encuentran la GCTCV-106, GCTCV-119, GCTCV-218 y GCTCV-247. La variedad GCTCV-218, también conocida como Formosana, ha ganado importancia entre los productores de banano debido a su moderada resistencia a *Foc*TR4 y su buen rendimiento en la producción. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, en el segundo ciclo de cultivo, dicha variedad es susceptible al patógeno (Munhoz et al., 2024; Viljoen et al., 2020).

1.4.3.2 *Análisis ómicos.*

Este enfoque está direccionado en la búsqueda de genes asociados a la defensa y resistencia de la planta, así como a la virulencia del patógeno mediante la transcriptómica. Este análisis compara la respuesta de una planta no infectada con *Foc* y una planta infectada (Rocha et al., 2021). Algunas investigaciones en este campo se han realizado mediante enfoques *in silico* utilizando como referencia el genoma secuenciado del ancestro más antiguo de los cultivos de banano, *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis* AA genome (W.-M. Li et al., 2020). La sobreexpresión o supresión de genes de plantas evaluadas se puede asociar a los genes de resistencia o susceptibilidad, dependiendo del caso (Anuradha et al., 2024; Dong et al., 2020; W.-M. Li et al., 2020). Además, el análisis de la expresión génica en *Foc* permite identificar los genes asociados a la virulencia o patogenicidad (Ding et al., 2024; S. Li et al., 2022; J. Wang, Zhang, et al., 2022). Investigaciones similares también se han llevado a cabo en el ámbito de la proteómica y metabolómica (He et al., 2021; Tian et al., 2023).

1.4.3.3 *Biocontrol y el uso de microorganismos benéficos.*

La tasa de infección o daño en las plantas ocasionadas por un fitopatógenos puede reducirse mediante diversas estrategias de manejo, que incluyen el uso de biocontroladores, la rotación de cultivos, entre otros (Rottstock et al., 2014). En el caso del banano, la rotación de cultivos no resulta práctica, por lo que la aplicación de microorganismos para mejorar la actividad del suelo es en general la alternativa más empleada. Además de contribuir a la salud de la planta, esta estrategia favorece a una producción más sostenible, al reducir el uso de agroquímicos, y más segura, debido a la baja toxicidad para los seres humanos en comparación con los fungicidas químicos (R. Singh et al., 2024).

Se han documentado que cepas de microorganismos pertenecientes a géneros de *Trichoderma* spp., *Piriformospora* spp., *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp., *Glomus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp., *Lysnibacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Streptomyces* spp. y *Rhizobium* spp. que muestran la capacidad de reducir la afectación de *Foc* (Du et al., 2022). Investigaciones han demostrado que las cepas de *Bacillus* y *Trichodermas* pueden disminuir la severidad de la Fusariosis con una eficacia similar a la de los fungicidas químicos, pero con el beneficio adicional de ser productos ecológicos (Castillo-Arévalo, 2023). Además, se ha encontrado evidencia del uso de *Trichoderma guizhouense*, que reduce la reproducción de *Foc*, y cuya acción se ve potencializada al interactuar con el hongo de género *Humicola* (Tao et al., 2023). En este sentido, la combinación de diferentes microorganismos, conocida como consorcios benéficos, puede ofrecer un control más efectivo contra *Foc* (Du et al., 2022). La creación de un consorcio de microorganismos es un proceso complejo, ya que su eficacia depende de las cepas seleccionadas, las propiedades del suelo, y la capacidad de interacción entre las cepas (Du et al., 2022; Munhoz et al., 2024). Por ello, se recomienda que los microorganismos utilizados provengan de zonas con condiciones similares a las de los cultivos de banano, tal como se hizo en este estudio.

CAPÍTULO 2

2 Metodología

2.1 Cepas evaluadas

Las cepas microbianas evaluadas obtenidas de la Colección de Cultivos de Microorganismos del CIBE (CCMCIBE) son originarias de Enmiendas Orgánicas Líquidas (EOL) en la provincia del Guayas; y de muestras de suelo, rizosfera y pseudotallo de banano de la provincia de Bolívar (Tabla 1). Los microorganismos obtenidos del suelo, rizosfera y pseudotallo de banano, fueron agrupados bajo la etiqueta “Banano”. La cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (*FocR1*) fue obtenida de estudios previos (Magdama, 2017), procedente de una localidad de la provincia del Guayas, con el código EC35-G-GM1, asociado Grupo de Compatibilidad Vegetativa (VCG)0120.

La reactivación de las bacterias se realizó en placas con medio agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) para las de EOL y agar tripticasa de soya (TSA, por sus siglas en inglés) para el grupo Banano. En cuanto a las cepas fúngicas, se utilizó el medio PDA con estreptomycinina a una concentración de 100 µg/mL.

Este estudio evaluó tres tipos de ensayos *in vitro*: enfrentamientos, difusión en agar e inoculación de suelo para la supresión de esporas. Además, se llevó a cabo un ensayo de patogenicidad con las cepas más prometedoras mediante la inoculación de plantas de banano Gros Michel. Debido al alto número de cepas a evaluar, se aplicó un criterio de selección antes de proceder con cada ensayo.

Tabla 1 Resumen de información de los microorganismos evaluados frente a FocRI. EOL: microorganismos obtenidos de enmiendas orgánicas líquidas;
 Banano: microorganismos obtenidos de suelo, rizosfera y pseudotallo de banano de plantaciones bananeras

Microorganismos	Grupo	Cantidad	Ubicación GPS	Codificación	Origen
Bacterias	EOL	102	Punto 1: 2°08'58.5" S 39 79°57'33.9" W Punto 2: 2° 10'15" S 79°13'41" W	###Z	CCMCIBE
Hongos	EOL	74	Punto 1: 2°08'58.5" S 39 79°57'33.9" W Punto 2: 2° 10'15" S 79°13'41" W	###Z	CCMCIBE
Hongos	Banano	36	Punto 1: 1°37'28.4" S 79°18'02.4" W Punto 2: 1°37'27.0" S 79°18'03.3" W	PH-##	CCMCIBE

2.2 Ensayos *in vitro*

Cada ensayo *in vitro* fue realizado por triplicado y como control positivo se utilizó sólo la cepa fúngica de *FocR1*

2.2.1 Ensayo de enfrentamiento.

2.2.1.1 Ensayo de enfrentamiento bacteriano contra *FocR1*.

El enfrentamiento de las bacterias se realizó siguiendo el protocolo de Fan et al., (2021) con las siguientes modificaciones: el segmento de 5 mm de diámetro de *Foc* se colocó en el centro de la placa de PDA separado a una distancia de 25 mm. Al lado opuesto, se sembró otra cepa bacteriana con las mismas indicaciones (Figura 1). Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 7 días. El porcentaje de inhibición radial (PIR) se lo calculó con la siguiente fórmula descrita por Fan et al., (2021).

$$\%PIR = \frac{R1 - R2}{R1};$$

R1: radio de FocR1 del control positivo; R2: radio de FocR1 del tratamiento

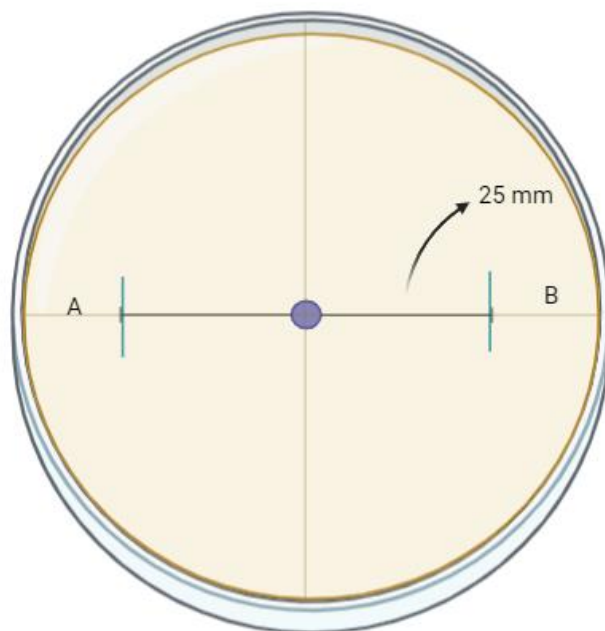


Figura 1 Gráfico representativo de la siembra de *FocR1* y cepas bacterianas en el ensayo de enfrentamiento

2.2.1.2 Ensayo de enfrentamiento fúngico contra *FocR1*.

Cada cepa fúngica fue evaluada mediante enfrentamiento dual con *FocR1* (Zhao et al., 2022). Se colocaron dos segmentos de 5 mm de diámetro de *Foc* y de la cepa a evaluarse, separadas a una distancia de 65 mm (Figura 2). Luego de 10 días de incubación a 28 °C se calculó el PIR generado por la cepa fúngica hacia el *FocR1* con la fórmula descrita previamente.

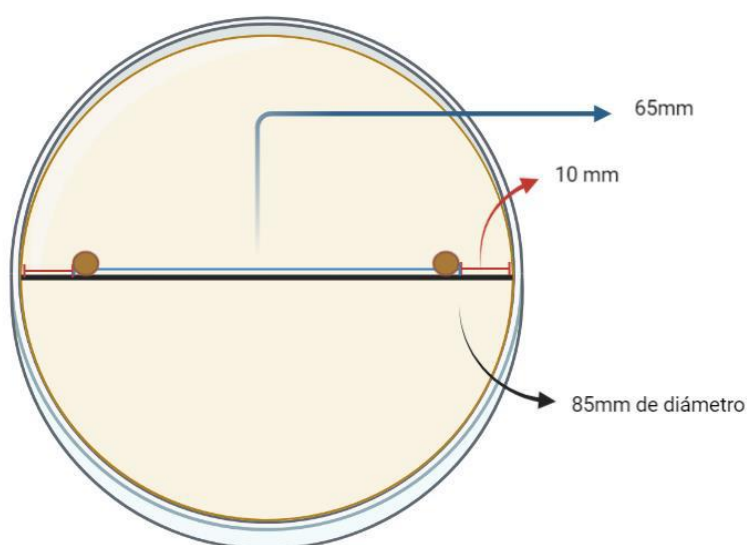


Figura 2 Gráfico representativo de la siembra de *FocR1* y cepas fúngicas en el ensayo de enfrentamiento

2.2.2 Ensayo de difusión en pozo de agar.

Las cepas con un PIR superior al 60 % (71 cepas) fueron evaluadas en el presente ensayo. Para la obtención del sobrenadante del grupo de bacterias seleccionadas, se siguió el protocolo de Shahid et al., (2021). En cuanto a la obtención de metabolitos fúngicos, se aplicó el protocolo propuesto por Mousumi Das et al. (2019).

Para la obtención de esporas de *FocR1* se siguió el protocolo de García-Bastidas et al. (2019) con las siguientes modificaciones: se inocularon 5 segmentos de 5 mm de diámetro de

FocR1 en medio líquido fréjol (8 g de fréjol mungo/ L) y se dejó incubar a 110 rpm durante 7 días a temperatura ambiente.

En la placa de PDA se sembró 10^5 conidios de *Foc* y, después de 1 hora de incubación, se realizaron 4 huecos de 5 mm con un sacabocado a 20 mm del centro (Figura 3). En cada hueco se añadió 50 μ l del sobrenadante a analizar. Para cada placa, se inoculó el sobrenadante de dos cepas y cada una con su respectiva pseudoréplica, siguiendo el protocolo de Baazeem et al. (2021), e incubando las placas por 48 horas a 28 °C.

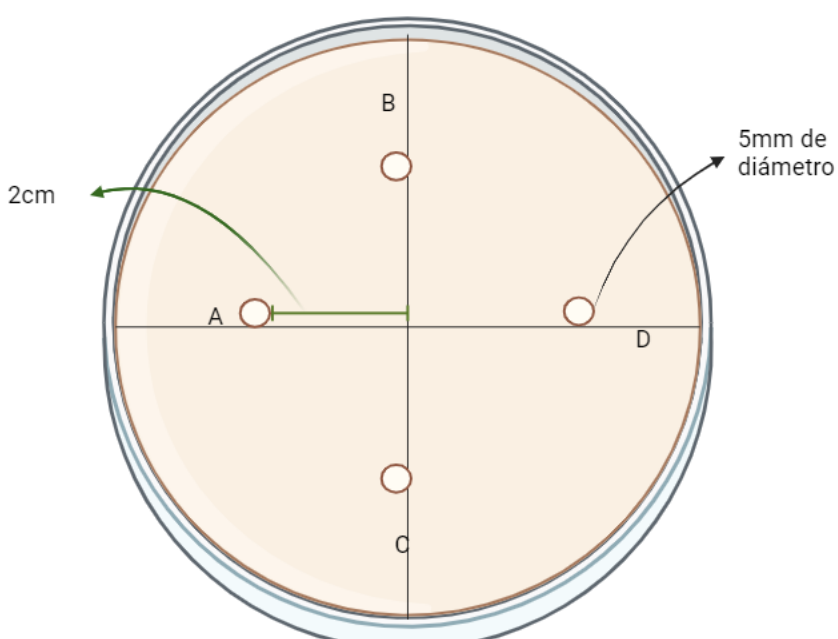


Figura 3 Gráfico representativo de la placa del ensayo de difusión en agar, en donde en los huecos (A, B, C, D) se agrega el sobrenadante de los microorganismos evaluados. Mientras que, en toda el área de la placa se siembra los conidios de *FocR1*.

En este ensayo se estableció la siguiente escala de evaluación (Tabla 2):

Tabla 2 Escala de evaluación para el ensayo de difusión en pozo de agar.

-	Sin inhibición: Crecimiento normal del hongo <i>Foc</i> , sin presencia de halos de inhibición ni alteraciones visibles.
+	Inhibición leve: Crecimiento reducido del hongo <i>Foc</i> , con indicios muy débiles o marginales de halos de inhibición.
++	Inhibición moderada: Crecimiento alterado o irregular del hongo <i>Foc</i> , con halos de inhibición parcialmente definidos.
+++	Inhibición alta: Ausencia total de crecimiento del hongo <i>Foc</i> , con halos de inhibición claramente definidos y evidentes.

Las cepas que obtuvieron los mejores resultados (++, +++) del presente ensayo fueron seleccionadas para la secuenciación tipo Sanger y ensayos posteriores.

2.2.3 Identificación molecular de cepas promisorias.

La extracción de ADN de las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante la técnica de lisis alcalina (Pérez-Pérez et al., 2019), que consistió en agregar la colonia bacteriana en 50 µl de NaOH 20mM. Luego, se realizó un vortex seguido de tres ciclos de calentamiento de 30 segundos en microondas.

La amplificación de la región 16S rRNA fue desarrollada mediante la PCR utilizando los *primers* universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3'). La mezcla de la reacción final contenía 1X GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), 0.4mM de cada primer y 1 µl de ADN. Las condiciones de amplificación en el termociclador fueron: 1 min a 96 °C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos de 1 min a 96 °C de desnaturalización, 1 min a 55 °C para el anillamiento y 1 min 50 s a 72 °C para la extensión. Finalmente, una extensión final a 72 °C durante 10 min.

La integridad del ADN amplificado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y la concentración se determinó utilizando un espectrofotómetro

NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific). La secuenciación Sanger de los amplicones fue realizada por un servicio externo en Macrogen Inc.

2.2.3.1 Análisis bioinformático.

Las secuencias fueron depuradas eliminando los extremos de mala calidad utilizando el programa FinchTV versión 1.4.0. A las secuencias depuradas se les buscó similitud con secuencias biológicas 16S rRNA subidas al Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) usando la herramienta BLAST. Posteriormente, se compararon las secuencias depuradas con secuencias biológicas de 16S rRNA disponibles en NCBI mediante la herramienta BLAST. Adicionalmente, se generó un árbol filogenético utilizando RAxML (Stamatakis, 2014) con 1000 bootstraps y modelo de evolución GTRGAMMA 5 para conocer la cercanía entre dichas especies.

Las cepas secuenciadas fueron reincorporadas a la Colección de Cultivos de Microorganismos del CIBE (CCM-CIBE) en la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

2.2.4 Evaluación en condiciones de suelo para la supresión de esporas.

El ensayo se llevó a cabo en cajas de Petri de vidrio estéril, a las cuales se les agregaron 50 gramos de suelo estéril proveniente de una plantación de banano (0°12'38.9"S 79°30'11.3"W), 6 ml de agua estéril, 2 ml de una suspensión de conidios de *Foc* (1×10^6 conidios/ml) y 2 ml de una suspensión de células de la cepa bacteriana correspondiente (1.2×10^9 células/ml). Se realizaron 5 réplicas por tratamiento. Como control negativo, se añadió al suelo 10 ml de agua estéril, y como control positivo se incorporaron 8 ml de agua estéril y 2 ml de la solución del patógeno (Einloft et al., 2021). Las placas fueron incubadas en una gaveta plástica a temperatura ambiente durante 30 días (Figura 4).



Figura 4 Incubación de las placas de la evaluación en condiciones de suelo simuladas.

La evaluación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) del patógeno se realizó en el medio Nash & Snyder modificado que contenía, 1 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L Peptona, 20 g/L Agar, 1 g PCNB (Terraclor 75%), 0.3 g estreptomycin y 0.12 g ampicilina. Se sembró el suelo diluido a 10^{-3} y se incubó durante 2 días a 28 °C para la posterior lectura de las UFC.

2.3 Ensayo de patogenicidad

Para este ensayo se seleccionaron dos cepas de *Pseudomonas* con la mejor actividad inhibitoria, identificada en ensayos previos. Además, se incluyeron dos cepas *Bacillus* y una cepa de *Stenotrophomonas*, las cuales destacaron en los ensayos de enfrentamiento y de metabolitos. Esta elección se respaldó en estudios previos y en la revisión de literatura, que reportan la actividad controladora de estos microorganismos contra la Fusariosis. La combinación de los tratamientos evaluados se describe en la Tabla 3.

Tabla 3 *Tratamientos evaluados en el ensayos in vivo en plantas de banano variedad Gros Michel en maceta*

Tratamientos	Género de la cepa benéfica	Cepas	Patógeno
Tratamiento 1	<i>Pseudomonas</i>	225Z	EC35-G-GM1
Tratamiento 2	<i>Bacillus</i>	381Z	EC35-G-GM1
Tratamiento 3	<i>Stenotrophomonas</i>	351Z	EC35-G-GM1
Tratamiento 4	<i>Pseudomonas</i>	227Z	EC35-G-GM1
Tratamiento 5	<i>Bacillus</i>	358Z	EC35-G-GM1
Tratamiento 6	Consorcio de <i>Pseudomonas</i>	225Z-227Z	EC35-G-GM1
Tratamiento 7	Consorcio de <i>Bacillus</i>	381Z-358Z	EC35-G-GM1
Tratamiento 8	Consorcio de todas las cepas	225Z-227Z-351Z-358Z-381Z	EC35-G-GM1
Control negativo	-	-	-
Control positivo	-	-	EC35-G-GM1

Se inocularon a *FocR1* y a los microorganismos promisorios siguiendo el protocolo de Izquierdo-García et al., (2024), con las siguientes modificaciones: en cada maceta se añadieron 2 kg de tierra preparada Aviluz (1% de Nitrógeno, 1% de fósforo, 1% de potasio, 1.9% de calcio, 1% de magnesio, 18.4% de materia orgánica, 2.6% de hierro) y se mezclaron con 100 ml de una suspensión de 5×10^7 conidios de *Foc*/ml. El suelo inoculado se incubó durante 7 días para permitir la colonización del patógeno previo al trasplante de las plantas Gros Michel. A los dos días posteriores al trasplante, se realizó la primera aplicación de 100 ml (1.5×10^8 células bacterianas/ml) de cada tratamiento, seguida de una segunda aplicación a los 9 días post-trasplante.

El ensayo se levantó a los 68 días post-trasplante. Se evaluó el área necrosada mediante cortes longitudinales desde el pseudotallo hasta el rizoma para el registro fotográfico para su posterior análisis. Además, se tomaron muestras de cada planta, las cuales

fueron almacenadas en tubos estériles de 50 ml a 4 °C para la verificación de la colonización del hongo mediante PCR.

2.3.1 Análisis del rizoma.

El nivel de necrosis interna de cada tratamiento se evaluó utilizando el software ImageJ. Con los datos recopilados, se calcularon la incidencia (DI), el efecto de biocontrol (BE) y la severidad (PDI) utilizando las siguientes fórmulas obtenidas de X. Wang et al., (2023):

$$DI: \frac{\text{Número de plantas infectadas}}{\text{Número de plantas observadas}} * 100\% \quad (2.1)$$

$$BE: \frac{\text{Incidencia en control positivo} - \text{Incidencia en tratamiento}}{\text{Incidencia en control positivo}} \quad (2.2)$$

$$PDI: \frac{\Sigma \text{ de las escalas de las plantas observadas}}{\text{Número de plantas observadas} * \text{máximo número de la escala usada}} * 100 \quad (2.3)$$

La escala utilizada para calcular la severidad (PDI) se basó en la propuesta por García-Bastidas, (2019) con una modificación en el rango de la escala de 0 a 5 (Figura 5). El porcentaje de área de daño de cada rizoma se evaluó utilizando el programa ImageJ (Schneider et al., 2012).

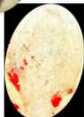
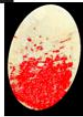
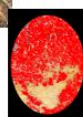
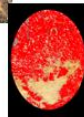
Escala	0	1	2	3	4	5
Porcentaje de daño	$X = 0\%$	$X \leq 5\%$	$5\% < X \leq 30\%$	$30\% < X \leq 50\%$	$50\% < X \leq 90\%$	Planta muerta
Imágenes de referencia	 	 	 	 	 	 

Figura 5 Escala de Fusariosis presentada en los rizomas de plantas Gros Michel.

2.3.2 Postulados de Koch.

Para cumplir con los postulados de Koch, el rizoma de cada planta fue esterilizado con etanol absoluto durante 45 segundos, seguido de una inmersión en cloro al 5 % durante 30 segundos, y finalmente, se pasó dos veces por agua estéril durante 15 segundos. Después de la desinfección, el rizoma se secó con toallas de papel estéril, se cortaron los bordes y el resto del rizoma se sembró en el medio Nash & Snyder. Entre el segundo y tercer día de la siembra, el microorganismo se aisló de la placa.

El ADN del hongo aislado se extrajo mediante el método de lisis alcalina descrito previamente. Se amplificaron dos regiones génicas: *Internal Transcribed Space* (ITS) y *Secreted in Xylem 9* (SIX9). Para la región ITS, se utilizaron los *primers* universales ITS-1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS-4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Para la región SIX9, se emplearon los *primers* *FocSIX9-F* (5' GCAGTTGCGGCAATGGCT 3') y *FocSIX9-R* (5' GCCCATCTGGTATCCGACA 3') (Magdama, 2017). Las reacciones de PCR se realizaron en volumen final de 15 μ l con concentración final de 1x GoTaq® Green (Promega), 0.4mM *primers* y 1 μ l de ADN. Las condiciones del termociclador para la amplificación del ITS fueron: 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minutos. Finalmente, una extensión de 72 °C por 10 minutos. Las condiciones para la amplificación de SIX9 fueron: 94 °C durante 10 minutos, 30

ciclos de 94 °C por 45 segundos, 58 °C durante 45 segundos y 72 °C por 30 segundos, finalmente una extensión de 72 °C por 10 minutos (Magdama, 2017).

2.4 *Análisis estadísticos*

Se utilizó estadística descriptiva e inferencial para el análisis de los ensayos. En los ensayos de enfrentamiento y difusión en pozo de agar, se generaron gráficos de barras para identificar las cepas que mostraron el mejor PIR y la cantidad de cepas que tuvieron mejores resultados (++ , +++), respectivamente.

En el ensayo realizado en condiciones de suelo simuladas, se empleó estadística inferencial para comparar las medias de UFC de cada tratamiento utilizando ANOVA. Posteriormente, se identificó qué tratamiento presentaba diferencias significativas en relación con el control positivo (C+) mediante la prueba de Tukey. Para el ensayo *in vivo* con plantas de banano variedad Gros Michel en macetas, se realizó una comparación estadística utilizando el método LSD de Fisher.

Todo el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software R versión 4.3.0 (2023-04-21 ucrt) y RStudio versión 2023.12.0 considerando que los resultados fueron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

CAPÍTULO 3

3 Resultados

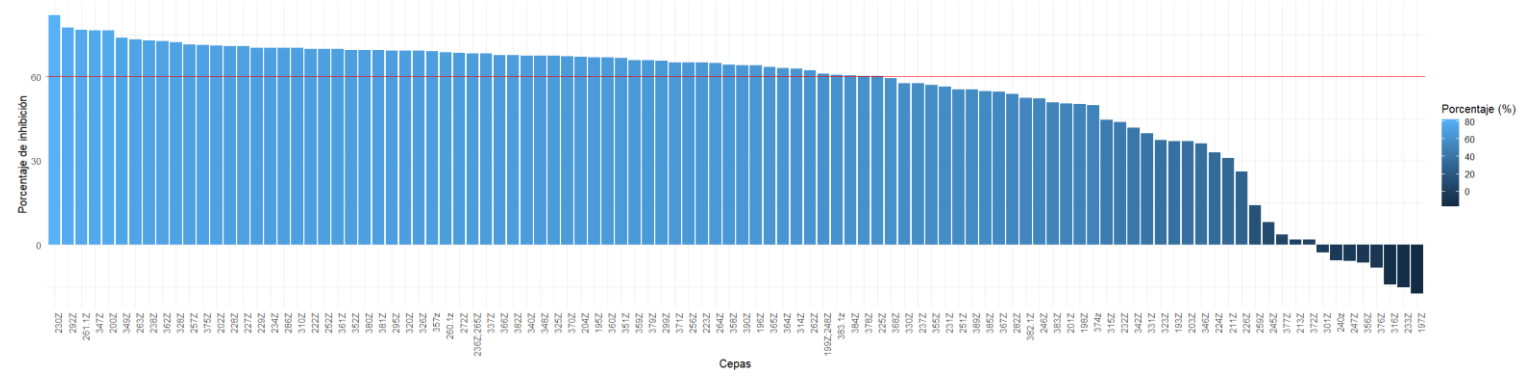
3.1 *Ensayo de enfrentamiento bacteriano contra FocR1*

De las 102 cepas bacterianas evaluadas contra *Foc*, sólo 2 cepas superaron el 80 % de PIR, mientras que, 8 cepas promovieron el crecimiento radial de *Foc* (Figura 6A). Los microorganismos que alcanzaron el criterio de selección (PIR > 60%) para el siguiente ensayo fueron 62 bacterias provenientes de la enmienda orgánica líquida (EOL).

3.2 *Ensayo de enfrentamiento fúngico contra FocR1*

De las 110 cepas fúngicas evaluadas, 4 alcanzaron el 100% del PIR. Además, se observó que 2 cepas no generaron inhibición y, 1 cepa, en particular, estimuló el crecimiento de *Foc*. El resto de las cepas mostró inhibición entre el 5 y el 100% (Figura 6B). Los microorganismos que cumplieron con el criterio de selección (PIR > 60%) para el siguiente ensayo fueron 6 aislados de EOL y 3 aislados de Banano.

A



B

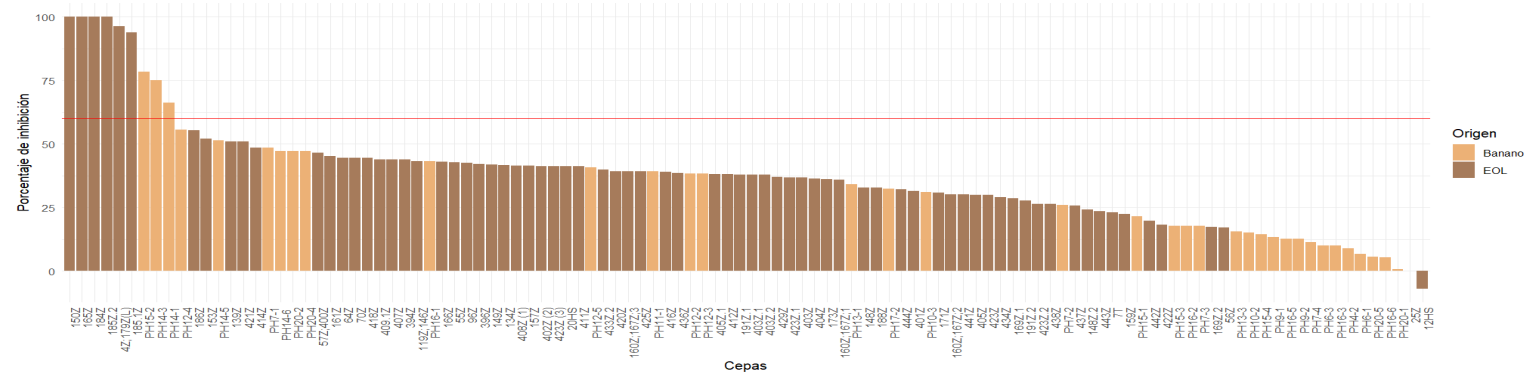


Figura 6 Porcentaje de inhibición de los microorganismos frente a FocR1. A) cepas bacterianas. B) cepas fúngicas.

3.3 *Ensayo de difusión en pozo de agar*

En este ensayo, se evaluaron 71 microorganismos (62 bacterias y 9 hongos) que cumplían con el criterio de evaluación de un PIR superior al 60%. Las condiciones de producción de metabolitos en el sobrenadante permitieron identificar 4 cepas bacterianas que generaron halos de inhibición marcados, mientras que 16 cepas presentaron halos medianamente marcados. Además, 21 cepas presentaron halos de menor intensidad según la escala y, 30 de las cepas no presentaron efecto inhibitorio (Figura 7).

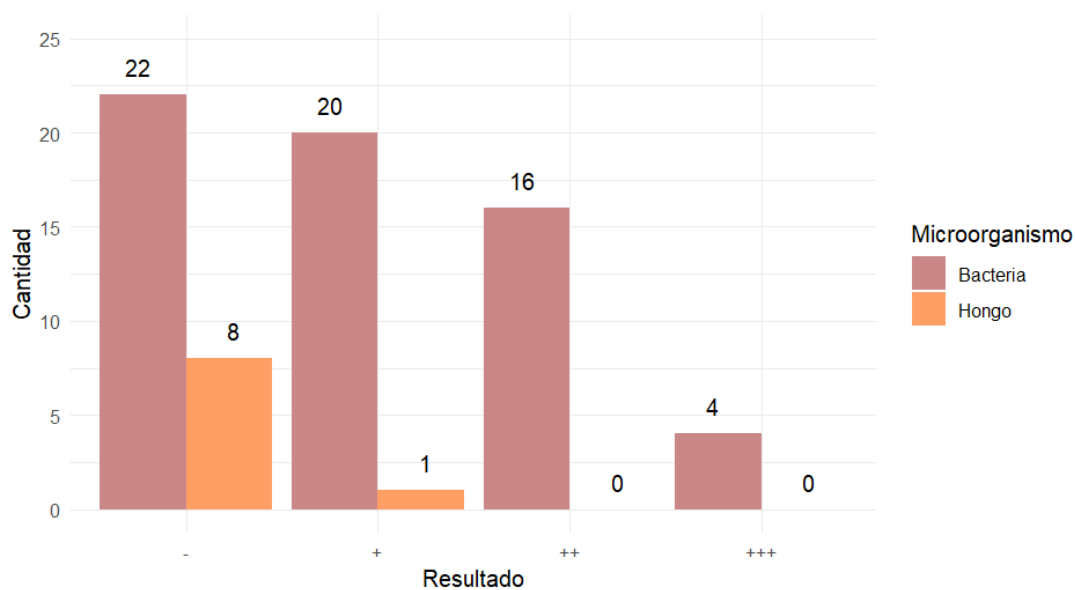
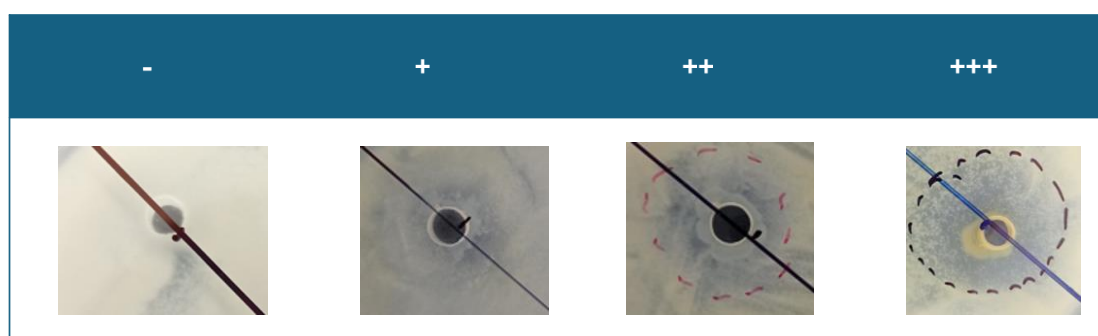
A**B**

Figura 7 Ensayo de evaluación de metabolitos. A) Cantidad de microorganismos por cada variable cualitativa en el ensayo de difusión en pozo de agar. B) Escala cualitativa.

3.4 Identificación molecular de las cepas promisorias

Los microorganismos con mayor actividad inhibitoria en los ensayos de enfrentamiento y en la producción de metabolitos secundarios fueron secuenciados.

Se identificaron tres géneros, *Bacillus*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*. Ninguna cepa fúngica mostró actividad en sus metabolitos, por lo que no fueron considerados para los

estudios posteriores. En la Figura 8 se presenta el árbol filogenético de los microorganismos evaluados.

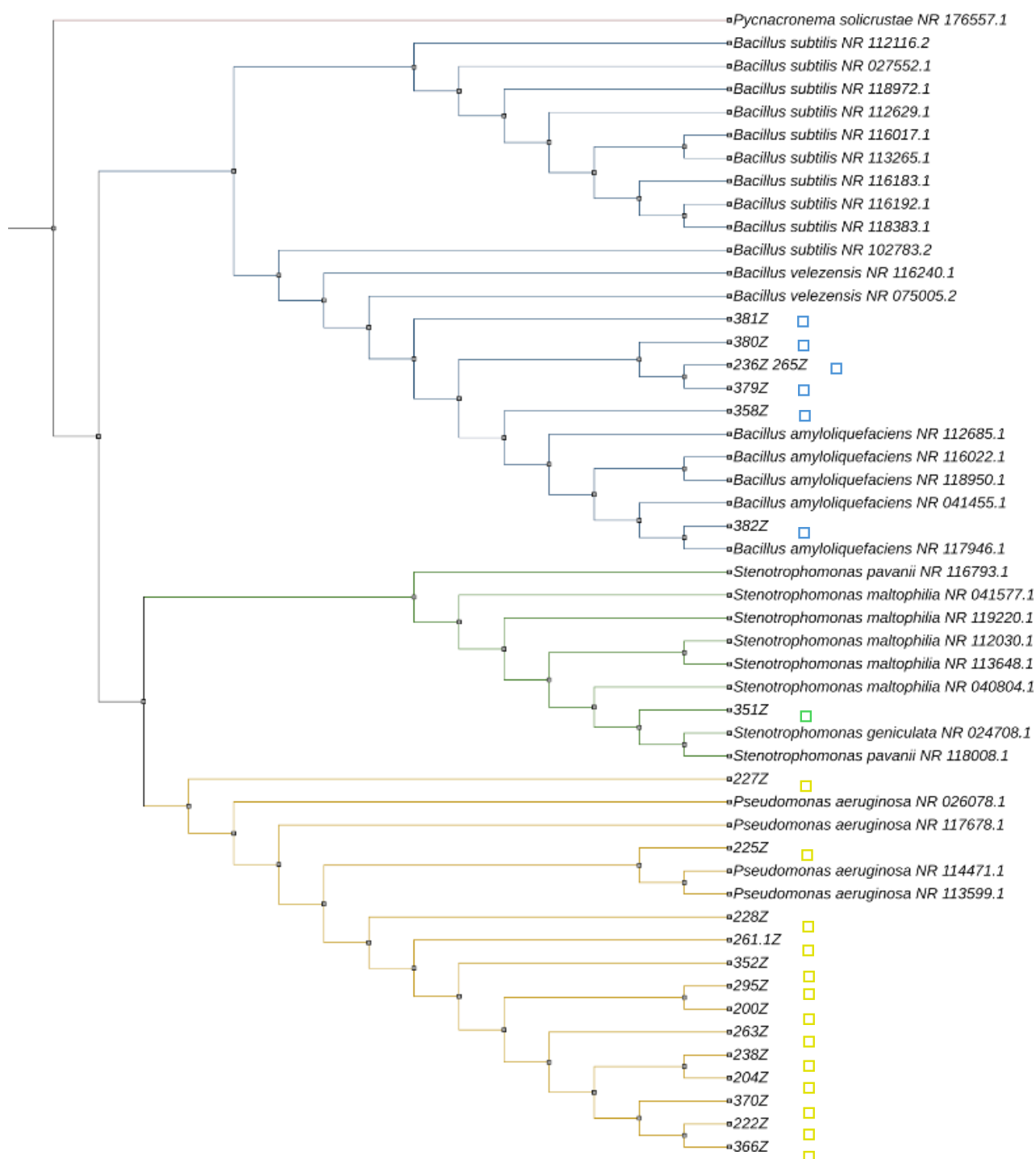


Figura 8 Árbol filogenético de las cepas que cumplieron el criterio de evaluación del ensayo de difusión en pozo de agar. Las cepas pertenecientes al ensayo tienen colocados un cuadrado (◻) del lado derecho de su código.

3.5 Evaluación en condiciones de suelo simuladas

Las cepas del género *Pseudomonas*, 227Z y 225Z, inhibieron significativamente el número de unidades formadoras de colonias en los 50 gramos de tierra.

Tabla 4 Respuesta de la interacción de cepas bacterianas en condiciones de suelo simuladas en el conteo de UFC de *Foc* luego de 30 días de co-incubación. C+: Control Positivo; C-: Control Negativo

Cepa	Género	Promedio Log (UFC de <i>Foc</i> /g de suelo)
C+		2.12±0.11 a
238Z	<i>Pseudomonas</i>	2.11±0.10 ab
380Z	<i>Bacillus</i>	1.98±0.14 ab
263Z	<i>Pseudomonas</i>	1.97±0.06 ab
204Z	<i>Pseudomonas</i>	1.94±0.22 abc
236Z;265Z	<i>Bacillus</i>	1.92±0.17 abc
200Z	<i>Pseudomonas</i>	1.91±0.05 abc
379Z	<i>Bacillus</i>	1.89±0.13 abc
370Z	<i>Pseudomonas</i>	1.88±0.13 abc
352Z	<i>Pseudomonas</i>	1.88±0.14 abc
295Z	<i>Pseudomonas</i>	1.88±0.08 abc
381Z	<i>Bacillus</i>	1.84±0.20 abc
351Z	<i>Stenotrophomonas</i>	1.83±0.16 abc
261.1Z	<i>Pseudomonas</i>	1.82±0.14 abc
222Z	<i>Pseudomonas</i>	1.79±0.41 abc
366Z	<i>Pseudomonas</i>	1.78±0.38 abc
382Z	<i>Bacillus</i>	1.70±0.12 abc
228Z	<i>Pseudomonas</i>	1.69±0.27 abc
358Z	<i>Bacillus</i>	1.67±0.15 abc
227Z	<i>Pseudomonas</i>	1.62±0.34 bc

225Z	<i>Pseudomonas</i>	1.46±0.25 c
C-		0.00±0.00 d

3.6 Ensayo de patogenicidad

En el presente ensayo se analizaron dos cepas de *Bacillus* (358Z y 381Z), dos cepas de *Pseudomonas* (225Z y 227Z) y una cepa del género *Stenotrophomonas* (351Z).

Los análisis realizados mediante el programa ImageJ (Anexos Tabla 11) y la escala mostrada en la Figura 5 indicaron que los tratamientos T7 (cepas de *Bacillus*: 381Z y 358Z) y el T5 (358Z) fueron los que presentaron la menor incidencia y severidad, lo que sugiere un mejor biocontrol.

Aunque los tratamientos T1, T2, T3 y T4 presentaron menor incidencia y severidad que el C+, no mostraron diferencias significativas. Como se observa en la Tabla 5, los tratamientos T1, T2, T3, T4, T6 y T8 no mostraron diferencias significativas en comparación con el C+. Por otro lado, los tratamientos de *Bacillus* fueron los que redujeron significativamente la incidencia y severidad de *Foc* en el presente estudio.

Tabla 5 Respuesta de tratamientos en la incidencia, severidad y biocontrol contra la Fusariosis del banano variedad Gros Michel. DI: Incidencia; PDI: Severidad; BE: Efecto de biocontrol sobre *Foc*

Tratamiento	Cepas	DI	PDI	BE
C+	--	100 a	56 a	0 a
T6	225Z-227Z	100 a	54 a	0 a
T8	225Z-227Z-351Z-358Z-381Z	100 a	51 ab	0 a
T1	225Z	90 ab	48 ab	10 ab
T2	381Z	90 ab	44 ab	10 ab
T3	351Z	90 ab	48 ab	10 ab
T4	227Z	90 ab	48 ab	10 ab

T7	381Z-358Z	70 b	34 b	30 b
T5	358Z	50 b	26 b	50 b

3.6.1 Postulados de Koch.

Se aislaron colonias con características morfológicas similares a las de *F. oxysporum* de todas las muestras tomadas de tejido sintomático tomadas de cada tratamiento. La relación con *Foc* raza 1 (VCG120) se confirmó mediante la amplificación del gen SIX9, un efector reportado en la forma patogénica cubense que afecta los bananos. Además, su identidad como hongos anamórficos fue validada por la amplificación de la región ITS.

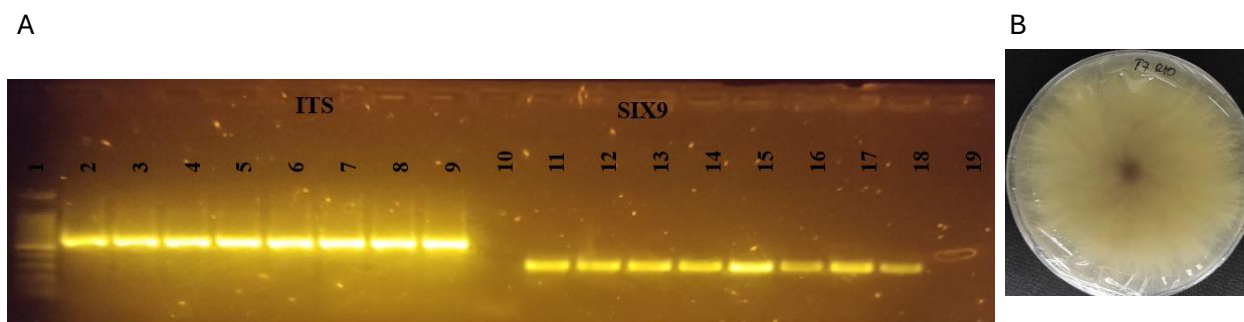


Figura 9 Confirmación del patógeno (*FocRI*) en base a los Postulados de Koch del ensayo in vivo. A) La posición 1 es el marcador molecular 100bp, los pocillos 2-9 son amplicones de ITS de diferentes aislados, el pocillo 10 es blanco de ITS, el pocillo 11-18 son amplicones de SIX9 de las muestras correspondientes y el pocillo 19 es blanco de SIX9. B) Uno de los aislado del rizoma, perteneciente al tratamiento 7 réplica 10

4 Discusiones

La búsqueda de microorganismos locales promisorios es compleja, pero no imposible. Hasta el momento las cepas más estudiadas con resultados prometedores pertenecen a los géneros de *Trichoderma*, *Bacillus* y *Pseudomonas*. Estas cepas están asociadas a la inducción de resistencia, promoción del crecimiento vegetal o mejora de suelos con características supresivas frente a *Foc* (Bubici et al., 2019). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de este estudio, donde las cepas de *Pseudomonas* presentaron una inhibición significativa en ensayos *in vitro* mientras que, las cepas de *Bacillus*, fueron las principales responsables de la inhibición en ensayos *in vivo*.

En otros estudios *in vitro* sobre ensayos de enfrentamiento se han identificado principalmente cepas bacterianas de *Bacillus*, *Streptomyces* y *Pseudomonas*. Estas cepas generan una significativa inhibición del crecimiento radial de *Foc*, con tasas de 80% (Fan et al., 2021), 66-74% (J. Wang, Cai, et al., 2022; Zhang et al., 2022) y, 69-75% (S. Li et al., 2022; Xie et al., 2023). En este estudio, las cepas secuenciadas del género *Bacillus* mostraron un PIR entre 64-70 %, mientras que las de *Pseudomonas* oscilaron entre 60-77% y la *Stenotrophomonas* alcanzó un PIR del 67%. Aunque se identificaron bacterias con un PIR superior (hasta el 82 %), éstas no presentaron buenos resultados en el segundo ensayo, el cual evaluó la acción de los metabolitos liberados en el sobrenadante. Del mismo modo, se han reportado cepas fúngicas, especialmente de *Trichoderma*, con una capacidad de inhibición del crecimiento radial de *Foc* superior al 60 % (Long et al., 2023; Win et al., 2021). En este estudio, se identificaron 9 cepas fúngicas que cumplieron con el criterio de selección del ensayo de enfrentamiento (PIR > 60%), de las cuales 6, pertenecientes a la EOL, lograron un PIR superior al 90%.

Para la selección de microorganismos promisorios con capacidad inhibitoria contra la Fusariosis, se consideró no solo la inhibición por competencia, sino también la producción de metabolitos con acción fungicida o fungistática. Este enfoque ha sido clave para identificar potenciales agentes de biocontrol. Entre los metabolitos encontrados se han reportado

lipopéptidos (Ramírez-Mejía et al., 2024), corticosteroides (Nayana et al., 2023) en cepas de *Bacillus*; En *Streptomyces* se han identificado lipopéptidos (X. Wang et al., 2023) y ácido bencenodicarboxílico (Zhang et al., 2022); Por su parte, en *Pseudomonas*, se han registrado metabolitos como cianuro de hidrógeno y amoníaco (Xie et al., 2023), sideróforos, quitinasas y lipasas (S. Li et al., 2022); En el caso del género *Trichoderma*, se ha documentado la producción de endoquitinasas, quitinasas, ácido tricotómico y otros metabolitos asociados a la actividad antifúngica frente a *Foc* (González et al., 2023).

En este estudio, se analizaron los metabolitos liberados en el sobrenadante de 71 cepas microbianas, entre las cuales, 20 cepas bacterianas demostraron capacidad para inhibir la germinación o el crecimiento de las esporas del patógeno, y fueron identificadas molecularmente como cepas de los géneros *Bacillus*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*. Sin embargo, las 51 cepas restantes no necesariamente carecen de actividad antifúngica. Su limitada producción de metabolitos podría estar influenciada por factores como las condiciones ambientales, la disponibilidad de nutrientes, mecanismos reguladores (Rabbee & Baek, 2023; J. Singh & Faull, 1988), o la ausencia de estímulos específicos (Doing et al., 2020).

Según la bibliografía disponible sobre ensayos *in vitro* e *in vivo*, las cepas de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* han demostrado actividad antifúngica contra *Foc*, lo cual coincide con los hallazgos de este estudio. En contraste no se ha reportado actividad antifúngica de *Stenotrophomonas* contra *Foc*. No obstante, algunas investigaciones han asociado a *Stenotrophomonas maltophilia* con la estimulación del crecimiento de plantas y el biocontrol de patógenos como *Colletotrichum nymphaeae* (Zahra et al., 2020), *Fusarium oxysporum* f.sp *cepae* (Dewi et al., 2023), *Pyricularia oryzae* (Badri Fariman et al., 2022). Aunque en este estudio la cepa de *Stenotrophomonas* no redujo significativamente la severidad ni incidencia de *Foc*, se recomienda profundizar en su análisis para determinar su posible rol en el proceso de infección del hongo o en la activación de mecanismos de defensa de las plantas.

Pocos ensayos *in vitro* se han evaluado en suelo estéril. Einloft et al., (2021) analizaron cepas del género *Bacillus* que mostraron una inhibición significativa de las UFC de *Fusarium verticillioides* después de 7 días de incubación. En el presente estudio, tras 30 días de exposición, las cepas de *Bacillus* evaluadas no generaron una inhibición significativa de las UFC de *Foc*. A pesar de que se seleccionaron las 20 cepas más prometedoras de los dos primeros ensayos *in vitro*, solo dos cepas de *Pseudomonas* (225Z y 227Z) lograron reducir de manera significativa la concentración de UFC de *Foc* al cabo de 30 días en condiciones de suelo simulado. Esta diferencia podría atribuirse a las propiedades del suelo, ya que la estructura del mismo puede influir en la disponibilidad de nutrientes, la difusión de oxígeno y el flujo de agua, factores que disminuyen el potencial de la actividad antagonista de algunas cepas (Hartmann & Six, 2023).

Para el ensayo de patogenicidad, se utilizaron plantas de la variedad Gros Michel y se seleccionaron las 5 cepas con los mejores resultados en las pruebas *in vitro*, las cuales pertenecían a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. Con fines comparativos, los tratamientos incluyeron tanto la inoculación de las cepas por separado como sus combinaciones en consorcios. Einloft et al., (2021) estudiaron la combinación de cepas del mismo género para controlar *Fusarium verticillioides* observando que esto generó un efecto de biocontrol más eficaz. Existen otros estudios que presentan resultados contrarios. Por ejemplo, Du et al., (2022) demostraron que la combinación de 5 cepas no necesariamente inhibe la Fusariosis de manera significativa en comparación con tratamientos que utilizan un menor número de cepas. Ellos observaron la acción de dos cepas juntas es similar a la combinación de cuatro cepas para el control de Fusariosis. Estos hallazgos coinciden con los del presente estudio, en el que el tratamiento 5 mostró un efecto de control similar al tratamiento 7 en el cual se utilizaron dos cepas de *Bacillus*.

En el este estudio se observó que las cepas *Pseudomonas* se destacaron en los ensayos *in vitro*, sin embargo, su efecto de biocontrol en el ensayo *in vivo* no fue el esperado. Este trabajo resalta la importancia de realizar pruebas de patogenicidad para evaluar el verdadero

potencial de biocontrol de las cepas. Este aspecto es crucial, ya que existen interacciones complejas entre el hospedero y el patógeno, así como variaciones ambientales y la interacción con otros organismos, factores que pueden influir en el comportamiento de las cepas benéficas (Clough et al., 2022).

Los hallazgos de este estudio refuerzan la importancia del uso de microorganismos benéficos para el control de la Fusariosis en banano. Sin embargo, futuras investigaciones deberían centrarse en evaluar la eficacia de estas cepas en condiciones de campo, así como en su interacción con otros factores ambientales. Además, se recomienda realizar análisis más detallados sobre los metabolitos involucrados en la actividad antifúngica observada.

5 Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Se identificaron 20 cepas bacterianas con potencial inhibidor de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1 mediante pruebas *in vitro*. Las cepas bacterianas mostraron altos porcentajes de inhibición, con valores de más del 60% de inhibición radial de Foc, destacando su posible uso como agentes de biocontrol.

El análisis genético permitió identificar que las cepas más efectivas de los ensayos *in vitro* pertenecían al género de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*.

La combinación de distintos métodos de evaluación (*in vitro* y en suelo simulado) permitió analizar múltiples aspectos del potencial antifúngico de los microorganismos, asegurando una selección robusta y enfocada en condiciones prácticas. Logrando filtrar 5 cepas bacterianas en ensayos *in vitro* de un grupo inicial de 212 microorganismos.

Las cepas de *Pseudomonas* (225z y 227z) demostraron una notable capacidad inhibitoria en ensayos *in vitro*, tanto en enfrentamientos directos como en la prueba del sobrenadante.

Las cepas de *Bacillus* de los tratamientos (T5 y T7) sobresalieron en ensayos *in vivo*, mostrando una inhibición significativa en la incidencia y severidad de la Fusariosis en plantas de banano variedad Gros Michel.

Aunque las cepas del género *Stenotrophomonas* lograron superar los criterios de selección, al ser evaluadas en condiciones más cercanas a la realidad agrícola, no mostraron inhibición significativa en el desarrollo de la Fusariosis.

Los resultados obtenidos sugieren que las cepas de *Bacillus* y sus metabolitos poseen un alto potencial como agentes de biocontrol contra FocR1. Esto representa una estrategia viable para mitigar la incidencia de Fusariosis en campo, promoviendo la producción sostenible y minimizando el uso de fungicidas químicos.

Recomendaciones

A partir de los hallazgos obtenidos, se recomienda realizar estudios detallados para identificar los metabolitos específicos responsables de la inhibición de la Fusariosis en plantas de banano variedad Gros Michel. Esto permitirá comprender en profundidad los mecanismos de biocontrol involucrados y optimizar su aplicación.

Durante las pruebas *in vivo* en plantas de banano, se recomienda minimizar los daños mecánicos ocasionados por factores externos como el traslado, el viento o caídas antes del trasplante en macetas. Estos daños pueden generar variabilidad en los resultados al evaluar los efectos del biocontrol sobre la Fusariosis.

Se sugiere mejorar la metodología de corte del rizoma durante el ensayo *in vivo*, realizando cortes paralelos para reducir el riesgo de falsos negativos en la detección de la Fusariosis. Asimismo, el tiempo de evaluación debe coincidir con el estado de desarrollo de la planta o esperar a que todos los controles positivos presenten síntomas claros de Fusariosis en las hojas.

Es recomendable evaluar la efectividad de las combinaciones de cepas seleccionadas en condiciones ambientales diversas y en distintos tipos de suelos representativos de las haciendas bananeras. Esto ayudará a determinar la robustez y adaptabilidad de las cepas promisorias.

Una vez finalizadas las pruebas en condiciones controladas, se sugiere realizar estudios a nivel de campo. Esto permitirá evaluar el comportamiento de las cepas en un entorno biológico más complejo y representativo de las condiciones reales de producción bananera.

6 Bibliografía

- Acuña, R., Rouard, M., Leiva, A. M., Marques, C., Olortegui, J. A., Ureta, C., Cabrera-Pintado, R. M., Rojas, J. C., Lopez-Alvarez, D., Cenci, A., Cuellar, W. J., & Dita, M. (2022). First Report of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* Tropical Race 4 Causing Fusarium Wilt in Cavendish Bananas in Peru. *Plant Disease*, 106(8), 2268.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1951-PDN>
- Ajila, J. P. L., Aguilar, M. A. E., Romero, H. R. C., & Campoverde, J. Q. (2023). Análisis de la producción y comercialización de banano en la provincia de El Oro en el periodo 2018-2022. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1), Article 1.
https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i1.4981
- Anuradha, C., Chandrasekar, A., Backiyarani, S., Thangavelu, R., Uma, S., & Selvarajan, R. (2024). Dataset from transcriptome profiling of *Musa* resistant and susceptible cultivars in response to *Fusarium oxysporum* f.sp. *Cubense* race1 and TR4 challenges using Illumina NovaSeq. *Data in Brief*, 52, 109803.
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.109803>
- Baazeem, A., Almanea, A., Manikandan, P., Alorabi, M., Vijayaraghavan, P., & Abdel-Hadi, A. (2021). In Vitro Antibacterial, Antifungal, Nematocidal and Growth Promoting Activities of *Trichoderma hamatum* FB10 and Its Secondary Metabolites. *Journal of Fungi*, 7(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/jof7050331>
- Badri Fariman, A., Abbasiliasi, S., Akmar Abdullah, S. N., Mohd Saud, H., & Wong, M.-Y. (2022). *Stenotrophomonas maltophilia* isolate UPMKH2 with the abilities to suppress rice blast disease and increase yield a promising biocontrol agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 121, 101872.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101872>

BANANO – Agrocalidad. (s. f.). Recuperado 15 de agosto de 2024, de

https://www.agrocalidad.gob.ec/BPA/?dt_portfolios=banano

Bin Mohd Zaini, H., Bin Sintang, M. D., Dan, Y. N., Ab Wahab, N., Bin Abdul Hamid, M., &

Pindi, W. (2019). Effect of addition of banana peel powder (*Musa balbisiana*) on physicochemical and sensory properties of fish patty. *British Food Journal*, 121(9), 2179-2189. <https://doi.org/10.1108/BFJ-02-2019-0130>

Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Gómez-Lama Cabanás, C., & Mercado-Blanco, J.

(2019). Biological Control Agents Against Fusarium Wilt of Banana. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616>

Castillo-Arévalo, T. (2023). Alternatives for the Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. Sp.

Cubense, Causal Agent of Fusarium wilt or Panama Disease in Guineo (*Musa balbisiana* ABB) Under Field Conditions. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, 10(02), 12-18. <https://doi.org/10.36347/sjavs.2023.v10i02.001>

Chang, W., Li, H., Chen, H., Qiao, F., & Zeng, H. (2020). NBS-LRR gene family in banana

(*Musa acuminata*): Genome-wide identification and responses to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1 and tropical race 4. *European Journal of Plant Pathology*, 157(3), 549-563. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02016-7>

Chen, A., Sun, J., Matthews, A., Armas-Egas, L., Chen, N., Hamill, S., Mintoff, S., Tran-

Nguyen, L. T. T., Batley, J., & Aitken, E. A. B. (2019). Assessing Variations in Host Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense Race 4 in *Musa* Species, With a Focus on the Subtropical Race 4. *Frontiers in Microbiology*, 10.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01062>

Chen, A., Sun, J., Viljoen, A., Mostert, D., Xie, Y., Mangila, L., Bothma, S., Lyons, R.,

Hřibová, E., Christelová, P., Uwimana, B., Amah, D., Pearce, S., Chen, N., Batley, J., Edwards, D., Doležel, J., Crisp, P., Brown, A. F., ... Aitken, E. A. B. (2023). Genetic

- Mapping, Candidate Gene Identification and Marker Validation for Host Plant Resistance to the Race 4 of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* Using *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis*. *Pathogens*, 12(6), Article 6.
<https://doi.org/10.3390/pathogens12060820>
- Clough, S. E., Jousset, A., Elphinstone, J. G., & Friman, V.-P. (2022). Combining in vitro and in vivo screening to identify efficient *Pseudomonas* biocontrol strains against the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. *MicrobiologyOpen*, 11(2), e1283.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.1283>
- Costa, E. L. da, Alencar, N. M. M., Rullo, B. G. dos S., & Taralo, R. L. (2017). Effect of green banana pulp on physicochemical and sensory properties of probiotic yoghurt. *Food Science and Technology*, 37, 363-368. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.01016>
- Da Silva, D. G. L., Da Silva, I. C. F., De Oliveira, J. F., Bellini, E. S. L., Klososki, S. J., & Pimentel, T. C. (2017). Effect of the addition of guava, apple, mango, or banana on the physical, chemical and microbiological characteristics and on the acceptance of Minas Frescal cheese during cold storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6), e13296. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13296>
- Dewi, R. R., Rahmah, S. M., Taruna, A., Aini, L. Q., Fernando, I., Abadi, A. L., & Syib'li, M. A. (2023). The Effectiveness Comparison Between Application of Indigenous Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community and *Stenotrophomonas maltophilia* to Suppress *Fusarium* Wilt Incidence on Local Garlic Plant (Lumbu Hijau) | Dewi | AGRIVITA Journal of Agricultural Science. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 45(1), 131-146. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v45i1.3970>
- Ding, Z., Lin, H., Liu, L., Lu, T., Xu, Y., Peng, J., Ren, Y., Peng, J., Xu, T., & Zhang, X. (2024). Transcription factor FoAce2 regulates virulence, vegetative growth,

- conidiation, and cell wall homeostasis in *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense*. *Fungal Biology*, 128(5), 1960-1967. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2024.06.002>
- Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., & Staver, C. P. (2018). Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>
- Dita Rodríguez, M. Á., Echegoyén Ramos, P. E., & Pérez Vicente, L. F. (2013). Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* en un país de la región del OIRSA. *ORGANISMO INTERNACIONAL REGIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA - OIRSA*.
- Doing, G., Koeppen, K., Occipinti, P., Harty, C. E., & Hogan, D. A. (2020). Conditional antagonism in co-cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*: An intersection of ethanol and phosphate signaling distilled from dual-seq transcriptomics. *PLOS Genetics*, 16(8), e1008783. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008783>
- Dong, H., Ye, Y., Guo, Y., & Li, H. (2020). Comparative transcriptome analysis revealed resistance differences of Cavendish bananas to *Fusarium oxysporum* f.sp. *Cubense* race1 and race4. *BMC Genetics*, 21(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00926-3>
- Du, C., Yang, D., Ye, Y., Pan, L., Zhang, J., Jiang, S., & Fu, G. (2022). Construction of a compound microbial agent for biocontrol against Fusarium wilt of banana. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1066807>
- EFSA Panel on Plant Health (PLH), Bragard, C., Baptista, P., Chatzivassiliou, E., Di Serio, F., Gonthier, P., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., MacLeod, A., Magnusson, C. S., Milonas, P., Navas-Cortes, J. A., Parnell, S., Potting, R., Stefani, E., Thulke, H.-H.,

- Van der Werf, W., Civera, A. V., Yuen, J., ... Reignault, P. L. (2022). Pest categorisation of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense Tropical Race 4. *EFSA Journal*, 20(1), e07092. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7092>
- Einloft, T. C., Hartke, S., de Oliveira, P. B., Saraiva, P. S., & Dionello, R. G. (2021). Selection of rhizobacteria for biocontrol of *Fusarium verticillioides* on non-rhizospheric soil and maize seedlings roots. *European Journal of Plant Pathology*, 160(3), 503-518. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02259-y>
- EPPO Global Database. (2024). *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense Tropical race 4 (FUSAC4). EPPO Global Database. <https://gd.eppo.int/taxon/FUSAC4/distribution>
- Fan, H., Li, S., Zeng, L., He, P., Xu, S., Bai, T., Huang, Y., Guo, Z., & Zheng, S.-J. (2021). Biological Control of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense Tropical Race 4 Using Natively Isolated *Bacillus* spp. YN0904 and YN1419. *Journal of Fungi*, 7(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/jof7100795>
- Garcia-Bastidas, F. (2022). *Fusarium oxysporum* f.sp. Cubense tropical race 4 (Foc TR4). *CABI Compendium*, CABI Compendium, 59074053. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.59074053>
- García-Bastidas, F. A. (2019). *Panama disease in banana: Spread, screens and genes*. <https://doi.org/10.18174/467427>
- García-Bastidas, F. A., Quintero-Vargas, J. C., Ayala-Vasquez, M., Schermer, T., Seidl, M. F., Santos-Paiva, M., Noguera, A. M., Aguilera-Galvez, C., Wittenberg, A., Hofstede, R., Sørensen, A., & Kema, G. H. J. (2020). First Report of *Fusarium* Wilt Tropical Race 4 in Cavendish Bananas Caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Plant Disease*, 104(3), 994-994. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN>
- García-Bastidas, F. A., Van der Veen, A. J. T., Nakasato-Tagami, G., Meijer, H. J. G., Arango-Isaza, R. E., & Kema, G. H. J. (2019). An Improved Phenotyping Protocol for Panama

Disease in Banana. *Frontiers in Plant Science*, 10.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01006>

González, M. F., Galarza, L., Valdez, L. L., & Quizhpe, G. M. (2023). Antifungal activity of metabolites from *Trichoderma* spp. Against *Fusarium oxysporum*. *Bionatura*, 8(2), 1-9. <https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.02.7>

González, B. C., Velasco, R. G., Feijoo, J. C. L., Bermudez, R. S., González, B. C., Velasco, R. G., Feijoo, J. C. L., & Bermudez, R. S. (2024). Early Selection for Resistance to *Fusarium* Wilt in Banana. En *Fusarium—Recent Studies*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1003201>

Guo, L., Yang, L., Liang, C., Wang, G., Dai, Q., & Huang, J. (2015). Differential Colonization Patterns of Bananas (*Musa* spp.) by Physiological Race 1 and Race 4 Isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Cubense*. *Journal of Phytopathology*, 163(10), 807-817. <https://doi.org/10.1111/jph.12378>

Hartmann, M., & Six, J. (2023). Soil structure and microbiome functions in agroecosystems. *Nature Reviews Earth & Environment*, 4(1), 4-18. <https://doi.org/10.1038/s43017-022-00366-w>

He, Y., Zhou, X., Li, J., Li, H., Li, Y., & Nie, Y. (2021). In Vitro Secretome Analysis Suggests Differential Pathogenic Mechanisms between *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* Race 1 and Race 4. *Biomolecules*, 11(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/biom11091353>

Helgi Library. (2021). *Banana Consumption Per Capita*. Helgi Library. <https://www.helgilibrary.com/indicators/banana-consumption-per-capita>

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., López-Pérez, P. A., Ferrera-Rodríguez, M. R., García-Ávila, C. de J., & Alarcon, A. (2022). QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ENZYMATIC PROFILE OF NATIVE *Trichoderma* STRAINS

AND BIOCONTROL POTENTIAL AGAINST *Fusarium oxysporum* f.sp. *Cubense* RACE 1. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.3264>

Informe sector bananero. (2023). AHK Ecuador.

<https://ecuador.ahk.de/es/infoteca/noticias/news-details/informe-sector-bananero>

Izquierdo-García, L. F., Carmona-Gutiérrez, S. L., Moreno-Velandia, C. A., Villarreal-Navarrete, A. del P., Burbano-David, D. M., Quiroga-Mateus, R. Y., Gómez-Marroquín, M. R., Rodríguez-Yzquierdo, G. A., & Betancourt-Vásquez, M. (2024). Microbial-Based Biofungicides Mitigate the Damage Caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* Race 1 and Improve the Physiological Performance in Banana. *Journal of Fungi*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/jof10060419>

Kashtwari, M., Mansoor, S., Wani, A. A., Najar, M. A., Deshmukh, R. K., Baloch, F. S., Abidi, I., & Zargar, S. M. (2022). Random mutagenesis in vegetatively propagated crops: Opportunities, challenges and genome editing prospects. *Molecular Biology Reports*, 49(6), 5729-5749. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06650-0>

Larrea Maldonado, C. (1987). *El banano en el Ecuador*. 16.

Li, S., Ma, J., Li, S., Chen, F., Song, C., Zhang, H., Jiang, M., & Shen, N. (2022). Comparative Transcriptome Analysis Unravels the Response Mechanisms of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Cubense* to a Biocontrol Agent, *Pseudomonas aeruginosa* Gxun-2. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms232315432>

Li, W.-M., Dita, M., Rouard, M., Wu, W., Roux, N., Xie, J.-H., & Ge, X.-J. (2020). Deep RNA-seq analysis reveals key responding aspects of wild banana relative resistance to *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* tropical race 4. *Functional & Integrative Genomics*, 20(4), 551-562. <https://doi.org/10.1007/s10142-020-00734-z>

- Long, W., Chen, Y., Wei, Y., Feng, J., Zhou, D., Cai, B., Qi, D., Zhang, M., Zhao, Y., Li, K., Liu, Y.-Z., Wang, W., & Xie, J. (2023). A newly isolated *Trichoderma Parareesei* N4-3 exhibiting a biocontrol potential for banana fusarium wilt by Hyperparasitism. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1289959>
- Magdama, F. (2017). *Population Biology Of Fusarium Oxysporum Associated With Banana In Ecuador* [Tesis doctorado, Pennsylvania State University] <https://etda.libraries.psu.edu/catalog/13920fam133>.
- Mejías Herrera, R., Hernández, Y., Magdama, F., Mostert, D., Bothma, S., Paredes Salgado, E. M., Terán, D., González, E., Angulo, R., Angel, L., Rodríguez, Y., Ortega, R., Viljoen, A., & Marys, E. E. (2023). First report of *Fusarium* wilt of Cavendish bananas caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* Tropical Race 4 in Venezuela. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-23-0781-PDN>
- Molina, A. B., Fabregar, E., Yi, G., & Viljoen, A. (2009). *RECENT OCCURRENCE OF FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. CUBENSE TROPICAL RACE 4 IN ASIA*. https://www.actahort.org/books/828/828_10.htm
- Mon, Y. Y., Bidabadi, S. S., Oo, K. S., & Zheng, S.-J. (2021). The antagonistic mechanism of rhizosphere microbes and endophytes on the interaction between banana and *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 116, 101733. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101733>
- Mosquera, L. E., Álvarez, D. A., Ritter, T., Mockshell, J., Vera, D., & Dita, M. (2023). *Banana value chain profile for Ecuador*:
- Mostafa, H. S. (2021). Banana plant as a source of valuable antimicrobial compounds and its current applications in the food sector. *Journal of Food Science*, 86(9), 3778-3797. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15854>

- Mousumi Das, M., Haridas, M., & Sabu, A. (2019). Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.021>
- Munhoz, T., Vargas, J., Teixeira, L., Staver, C., & Dita, M. (2024). *Fusarium* Tropical Race 4 in Latin America and the Caribbean: Status and global research advances towards disease management. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1397617>
- Nayana, R. U. K., Nakkeeran, S., Saranya, N., Saravanan, R., Mahendra, K., Ashraf, S., Perveen, K., Alshaikh, N. A., Sayyed, R. Z., & Show, P. L. (2023). Triamcinolone Acetonide Produced by *Bacillus velezensis* YEBBR6 Exerts Antagonistic Activity Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*: A Computational Analysis. *Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00797-w>
- Oliveira de Souza, N. C., de Lacerda de Oliveira, L., Rodrigues de Alencar, E., Moreira, G. P., Santos Leandro, E. dos, Ginani, V. C., & Zandonadi, R. P. (2018). Textural, physical and sensory impacts of the use of green banana puree to replace fat in reduced sugar pound cakes. *LWT*, 89, 617-623. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.050>
- Pandurangan, M. T., & Kanny, K. (2020). Study of Curing Characteristics of Cellulose Nanofiber-Filled Epoxy Nanocomposites. *Catalysts*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/catal10080831>
- Pegg, K. G., Coates, L. M., O'Neill, W. T., & Turner, D. W. (2019). The Epidemiology of *Fusarium* Wilt of Banana. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01395>

- Pegg, K. G., & Langdon, P. W. (1987). *Fusarium wilt (Panama disease): A review*.
[https://scholar.google.com/scholar_lookup?author=K.%20G.+Pegg&author=P.%20W.+Langdon&publication_year=1987&book=Fusarium+wilt+\(Panama+disease\):+a+review.&volume=21&pages=119](https://scholar.google.com/scholar_lookup?author=K.%20G.+Pegg&author=P.%20W.+Langdon&publication_year=1987&book=Fusarium+wilt+(Panama+disease):+a+review.&volume=21&pages=119)
- Pelissari, F. M., Sobral, P. J. do A., & Menegalli, F. C. (2014). Isolation and characterization of cellulose nanofibers from banana peels. *Cellulose*, 21(1), 417-432.
<https://doi.org/10.1007/s10570-013-0138-6>
- Pereira, J., Brohi, S. A., Malairaj, S., Zhang, W., & Zhou, G.-H. (2020). Quality of fat-reduced frankfurter formulated with unripe banana by-products and pre-emulsified sunflower oil. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 420-433.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1733014>
- Pérez-Pérez, R., Oudot, M., Serrano, L., Hernández, I., Nápoles, M., Sosa, D., & Pérez-Martínez, S. (2019). Rhizospheric rhizobia identification in maize (*Zea mays* L.) plants. *Agronomía Colombiana*, 37(3), Article 3.
<https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v37n3.80189>
- Ploetz, R. C. (2015). Fusarium Wilt of Banana. *Phytopathology*®, 105(12), 1512-1521.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>
- Puhalla, J. E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, 63(2), 179-183.
<https://doi.org/10.1139/b85-020>
- Rabbee, M. F., & Baek, K.-H. (2023). Detection of Antagonistic Compounds Synthesized by *Bacillus velezensis* against *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* by Metabolome and RNA Sequencing. *Microorganisms*, 11(6), Article 6.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11061523>

- Ramírez-Mejía, J. M., Villegas-Escobar, V., & Gómez, L. A. (2024). Lipopeptides from *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 and cinnamon extract decrease the bioenergetic response of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense. *European Journal of Plant Pathology*, 170(1), 91-103. <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02882-5>
- Rocha, A. de J., Soares, J. M. da S., Nascimento, F. dos S., Santos, A. S., Amorim, V. B. de O., Ferreira, C. F., Haddad, F., Santos-Serejo, J. A. dos, & Amorim, E. P. (2021). Improvements in the Resistance of the Banana Species to Fusarium Wilt: A Systematic Review of Methods and Perspectives. *Journal of Fungi*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/jof7040249>
- Rottstock, T., Joshi, J., Kummer, V., & Fischer, M. (2014). Higher plant diversity promotes higher diversity of fungal pathogens, while it decreases pathogen infection per plant. *Ecology*, 95(7), Article 7. <https://doi.org/10.7892/boris.58172>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shahid, I., Han, J., Hanooq, S., Malik, K. A., Borchers, C. H., & Mehnaz, S. (2021). Profiling of Metabolites of *Bacillus* spp. And Their Application in Sustainable Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.605195>
- Singh, J., & Faull, J. L. (1988). Antagonism and Biological Control. En *Biocontrol Of Plant Diseases*. CRC Press.
- Singh, R., Kaur, S., Bhullar, S. S., Singh, H., & Sharma, L. K. (2024). Bacterial biostimulants for climate smart agriculture practices: Mode of action, effect on plant growth and roadmap for commercial products. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, 3(1), e12085. <https://doi.org/10.1002/sae2.12085>

- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(9), 1312-1313.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Sun, Y., Huang, B., Cheng, P., Li, C., Chen, Y., Li, Y., Zheng, L., Xing, J., Dong, Z., & Yu, G. (2022). Endophytic *Bacillus subtilis* TR21 Improves Banana Plant Resistance to *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* and Promotes Root Growth by Upregulating the Jasmonate and Brassinosteroid Biosynthesis Pathways. *Phytopathology®*, 112(2), 219-231. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-21-0159-R>
- Suniati, F. R. T., & Purnomo, H. (2019). Goroho (*Musa acuminata*, sp) banana flour as natural antioxidant source in Indonesian meatball production. *Food Research*, 678-683. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(6\).302](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(6).302)
- Tao, C., Wang, Z., Liu, S., Lv, N., Deng, X., Xiong, W., Shen, Z., Zhang, N., Geisen, S., Li, R., Shen, Q., & Kowalchuk, G. A. (2023). Additive fungal interactions drive biocontrol of *Fusarium* wilt disease. *New Phytologist*, 238(3), 1198-1214.
<https://doi.org/10.1111/nph.18793>
- Tian, D., Qin, L., Verma, K. K., Wei, L., Li, J., Li, B., Zhou, W., He, Z., Wei, D., Huang, S., Long, S., Huang, Q., Li, C., & Wei, S. (2023). Transcriptomic and metabolomic differences between banana varieties which are resistant or susceptible to *Fusarium* wilt. *PeerJ*, 11, e16549. <https://doi.org/10.7717/peerj.16549>
- Tibolla, H., Pelissari, F. M., Martins, J. T., Vicente, A. A., & Menegalli, F. C. (2018). Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and mechanical treatments: Characterization and cytotoxicity assessment. *Food Hydrocolloids*, 75, 192-201. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.027>
- Tinzaara, W., Mutambuka, M., Oyesigye, E., Blomme, G., Dita, M., Gold, C. S., Rouard, M., & Karamura, E. (2024). Banana wilt diseases: Current status and future research

- strategies for their management. *International Journal of Pest Management*, 70(3), 290-309. <https://doi.org/10.1080/09670874.2021.1992685>
- Vargas Perez, J., Serrano, L., Viteri, R., Sosa, D., Romero, C. A., & Diez, N. (2024). Antarctic Streptomyces: Promising biocontrol agents for combating *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Biotechnology Reports*, 43, e00852. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00852>
- Veliz, K., Chico-Santamarta, L., & Ramirez, A. D. (2022). The Environmental Profile of Ecuadorian Export Banana: A Life Cycle Assessment. *Foods*, 11(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/foods11203288>
- Viljoen, A., Mostert, D., Chiconela, T., Beukes, I., Fraser, C., Dwyer, J., Murray, H., Amisse, J., Matabuana, E. L., Tazan, G., Amugoli, O. M., Mondjana, A., Vaz, A., Pretorius, A., Bothma, S., Rose, L. J., Beed, F., Dusunceli, F., Chao, C.-P., & Molina, A. (2020). Occurrence and spread of the banana fungus *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense TR4 in Mozambique. *South African Journal of Science*, 116(11/12), Article 11/12. <https://doi.org/10.17159/sajs.2020/8608>
- Wang, J., Cai, B., Li, K., Zhao, Y., Li, C., Liu, S., Xiang, D., Zhang, L., Xie, J., & Wang, W. (2022). Biological Control of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense Tropical Race 4 in Banana Plantlets Using Newly Isolated *Streptomyces* sp. WHL7 from Marine Soft Coral. *Plant Disease*, 106(1), 254-259. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1275-RE>
- Wang, J., Zhang, K., Huang, L.-Q., Bao, H.-N., Hai, N., Yang, Y.-B., Liu, S.-W., Li, C.-Y., & Yao, N. (2022). Loss of glucosylceramide synthase impairs the growth and virulence of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense. *Phytopathology Research*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s42483-022-00136-y>
- Wang, X., Du, Z., Chen, C., Guo, S., Mao, Q., Wu, W., Wu, R., Han, W., Xie, P., Zeng, Y., Shan, W., Wang, Z., & Yu, X. (2023). Antifungal effects and biocontrol potential of

- lipopeptide-producing *Streptomyces* against banana Fusarium wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense*. *Frontiers in Microbiology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1177393>
- Wang, X., Yu, R., & Li, J. (2021). Using Genetic Engineering Techniques to Develop Banana Cultivars With Fusarium Wilt Resistance and Ideal Plant Architecture. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617528>
- Westerhoven, A. C. van, Meijer, H. J. G., Seidl, M. F., & Kema, G. H. J. (2022). Uncontained spread of Fusarium wilt of banana threatens African food security. *PLOS Pathogens*, 18(9), e1010769. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010769>
- Win, T. T., Bo, B., Malec, P., Khan, S., & Fu, P. (2021). Newly isolated strain of *Trichoderma asperellum* from disease suppressive soil is a potential bio-control agent to suppress Fusarium soil borne fungal phytopathogens. *Journal of Plant Pathology*, 103(2), 549-561. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00780-x>
- Xie, J., Singh, P., Qi, Y., Singh, R. K., Qin, Q., Jin, C., Wang, B., & Fang, W. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* Strain 91: A Multifaceted Biocontrol Agent against Banana Fusarium Wilt. *Journal of Fungi*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/jof9111047>
- Zahra, A., Jahanshir, A., Morahem, A., & Bahman, B. (2020). Volatile compounds mediated effects of *Stenotrophomonas maltophilia* strain UN1512 in plant growth promotion and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 112, 101555. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101555>
- Zhang, L., Liu, Z., Wang, Y., Zhang, J., Wan, S., Huang, Y., Yun, T., Xie, J., & Wang, W. (2022). Biocontrol Potential of Endophytic *Streptomyces malaysiensis* 8ZJF-21 From Medicinal Plant Against Banana Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Cubense* Tropical Race 4. *Frontiers in Plant Science*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.874819>

Zhao, X., Hou, D., Xu, J., Wang, K., & Hu, Z. (2022). Antagonistic Activity of Fungal Strains against Fusarium Crown Rot. *Plants*, *11*(3), Article 3.

<https://doi.org/10.3390/plants11030255>

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 6 *Porcentaje de inhibición de FocR1 ocasionado por las cepas fúngicas evaluadas originarias del grupo Banano*

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Desv. Stdr
PH15-2	79.11	77.22	79.11	78.48	1.10
PH14-3	79.73	81.76	63.51	75.00	10.00
PH14-1	67.57	65.54	65.54	66.22	1.17
PH12-4	55.09	58.68	53.29	55.69	2.74
PH14-5	55.09	46.11	53.29	51.50	4.75
PH7-1	47.90	47.90	49.70	48.50	1.04
PH14-6	47.30	47.30	47.30	47.30	0.00
PH20-2	43.24	47.30	51.35	47.30	4.05
PH20-4	49.32	47.30	45.27	47.30	2.03
PH16-1	39.19	43.24	47.30	43.24	4.05
PH12-5	42.51	40.72	38.92	40.72	1.80
PH11-1	39.19	41.22	37.16	39.19	2.03
PH12-2	37.13	38.92	38.92	38.32	1.04
PH12-3	37.13	40.72	37.13	38.32	2.07
PH13-1	37.13	24.55	40.72	34.13	8.49
PH17-2	31.08	31.08	35.14	32.43	2.34
PH10-3	31.08	33.11	29.05	31.08	2.03
PH7-2	22.15	35.44	20.25	25.95	8.28
PH15-1	29.94	22.75	11.98	21.56	9.04
PH7-3	18.35	18.35	16.46	17.72	1.10
PH15-3	14.56	20.25	18.35	17.72	2.90
PH16-2	16.46	20.25	16.46	17.72	2.19

PH13-3	12.66	15.51	18.35	15.51	2.85
PH10-2	14.56	16.46	14.56	15.19	1.10
PH15-4	16.46	16.46	10.76	14.56	3.29
PH9-1	10.76	12.66	16.46	13.29	2.90
PH9-2	12.66	14.56	10.76	12.66	1.90
PH16-5	6.96	14.56	16.46	12.66	5.02
PH7-4	13.77	10.18	10.18	11.38	2.07
PH6-3	8.78	12.84	8.78	10.14	2.34
PH16-3	12.00	10.00	8.00	10.00	2.00
PH4-2	6.96	5.06	14.56	8.86	5.02
PH6-1	6.00	10.00	4.00	6.67	3.06
PH20-5	8.86	3.16	5.06	5.70	2.90
PH16-6	8.00	4.00	4.00	5.33	2.31
PH20-1	-2.00	6.00	-2.00	0.67	4.62

Anexo 2

Tabla 7 Porcentaje de inhibición de *FocR1* ocasionado por las cepas fúngicas evaluadas originarias del EOL

Cepa	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Desv. Est.
150Z	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
165Z	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
184Z	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
185Z.2	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00
4Z;179Z(L)	98.20	98.20	92.79	96.40	3.12
185.1Z	83.78	100.00	97.97	93.92	8.84
186Z	73.65	45.27	47.30	55.41	15.83
153Z	58.00	46.00	52.00	52.00	6.00
139Z	53.62	51.69	47.83	51.05	2.95
421Z	50.33	52.32	50.33	50.99	1.15
414Z	43.24	49.32	53.38	48.65	5.10
57Z;400Z	44.52	48.63	46.58	46.58	2.05
161Z	47.74	45.81	41.94	45.16	2.96
64Z	44.00	44.00	46.00	44.67	1.15
70Z	30.00	52.00	52.00	44.67	12.70
418Z	45.54	43.66	44.60	44.60	0.94
409.1Z	43.96	42.03	45.89	43.96	1.93
407Z	41.94	43.87	45.81	43.87	1.94
394Z	40.74	42.59	48.15	43.83	3.85
119Z;146Z	42.03	42.03	45.89	43.32	2.23
166Z	43.66	41.78	43.66	43.04	1.08
55Z	40.79	44.74	42.76	42.76	1.97

96Z	43.24	41.22	43.24	42.57	1.17
396Z	38.89	39.62	48.15	42.22	5.15
149Z	45.27	39.19	41.22	41.89	3.10
134Z	41.78	39.91	43.66	41.78	1.88
408Z (1)	34.87	38.82	50.66	41.45	8.22
157Z	41.44	44.52	38.36	41.44	3.08
402Z (2)	46.30	38.89	38.89	41.36	4.28
423Z (3)	44.44	42.59	37.04	41.36	3.85
20HS	42.00	42.00	40.00	41.33	1.15
411Z	45.27	37.16	41.22	41.22	4.05
433Z.2	39.91	39.91	39.91	39.91	0.00
420Z	46.00	44.00	28.00	39.33	9.87
160Z;167Z;3	40.00	37.86	40.00	39.29	1.24
425Z	41.22	39.19	37.16	39.19	2.03
416Z	38.41	40.40	38.41	39.07	1.15
436Z	37.16	39.19	39.19	38.51	1.17
405Z.1	38.82	36.84	38.82	38.16	1.14
412Z	38.06	41.94	34.19	38.06	3.87
191Z.1	36.84	37.83	38.82	37.83	0.99
403Z.1	38.82	36.84	37.83	37.83	0.99
403Z.2	38.82	36.84	37.83	37.83	0.99
429Z	35.19	38.89	37.04	37.04	1.85
423Z.1	36.15	34.27	39.91	36.78	2.87
403Z	33.33	41.78	35.19	36.77	4.44
404Z	36.30	36.30	36.30	36.30	0.00
173Z	36.13	36.13	36.13	36.13	0.00
160Z;167Z;1	35.85	35.85	35.85	35.85	0.00

148Z	36.13	34.19	28.39	32.90	4.03
188Z	35.71	29.29	33.57	32.86	3.27
444Z	30.32	34.19	32.26	32.26	1.94
401Z	32.26	28.39	34.19	31.61	2.96
171Z	35.19	29.63	27.78	30.86	3.85
160Z;167Z;2	30.19	30.19	30.19	30.19	0.00
441Z	30.14	30.14	30.14	30.14	0.00
405Z	29.29	27.14	33.57	30.00	3.27
423Z	31.43	29.29	29.29	30.00	1.24
434Z	30.46	26.49	30.46	29.14	2.29
169Z.1	26.76	28.64	30.52	28.64	1.88
191Z.2	27.78	29.63	25.93	27.78	1.85
423Z.2	25.00	27.14	27.14	26.43	1.24
438Z	26.42	26.42	26.42	26.42	0.00
437Z	26.42	26.42	24.53	25.79	1.09
148Z.2	16.43	27.14	29.29	24.29	6.89
443Z	24.88	23.00	23.00	23.63	1.08
7T	24.88	23.00	21.13	23.00	1.88
159Z	21.13	23.00	23.00	22.38	1.08
442Z	23.00	17.37	19.25	19.87	2.87
422Z	16.91	18.84	18.84	18.20	1.12
169Z.2	19.25	17.37	15.49	17.37	1.88
56Z	7.24	26.97	17.11	17.11	9.87
25Z	-2.00	4.00	-2.00	0.00	3.46
12HS	-12.08	-4.35	-4.35	-6.92	4.46

Anexo 3

Tabla 8 *Porcentaje de inhibición de FocRI ocasionado por las cepas bacterianas evaluadas originarias del EOL*

Cepa	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	DESV
230Z	83.76	81.05	81.05	81.95	1.56
292Z	81.08	75.68	75.68	77.48	3.12
261.1Z	77.55	77.55	75.05	76.72	1.44
347Z	78.95	74.27	76.61	76.61	2.34
200Z	75.68	75.68	78.38	76.58	1.56
349Z	72.97	70.27	78.38	73.87	4.13
263Z	72.35	75.12	72.35	73.27	1.60
238Z	72.97	70.27	75.68	72.97	2.70
362Z	72.65	75.38	69.91	72.65	2.74
328Z	72.35	75.12	69.59	72.35	2.76
257Z	70.22	72.93	71.57	71.57	1.91
375Z	70.47	73.15	70.47	71.36	1.55
202Z	67.57	75.68	70.27	71.17	4.13
228Z	70.07	70.07	72.79	70.98	1.57
227Z	73.79	70.87	67.96	70.87	2.91
229Z	70.22	64.81	75.63	70.22	5.41
234Z	70.22	70.22	70.22	70.22	0.00
286Z	67.51	70.22	72.93	70.22	2.71
310Z	72.93	70.22	67.51	70.22	2.71
222Z	72.65	67.18	69.91	69.91	2.74
361Z	75.38	67.18	67.18	69.91	4.74

252Z	69.91	69.91	69.91	69.91	0.00
352Z	69.59	69.59	69.59	69.59	0.00
380Z	67.79	67.79	73.15	69.57	3.10
381Z	67.79	70.47	70.47	69.57	1.55
295Z	64.81	70.22	72.93	69.32	4.14
326Z	67.51	67.51	72.93	69.32	3.13
320Z	67.51	70.22	70.22	69.32	1.56
357z	70.47	69.13	67.79	69.13	1.34
260.1z	69.72	66.97	69.72	68.81	1.59
272Z	70.27	67.57	67.57	68.47	1.56
236Z;265Z	72.56	72.56	60.08	68.40	7.20
337Z	67.41	70.37	67.41	68.40	1.71
366Z	67.79	65.10	70.47	67.79	2.68
382Z	67.79	67.79	67.79	67.79	0.00
340Z	67.57	67.57	67.57	67.57	0.00
348Z	67.57	67.57	67.57	67.57	0.00
325Z	67.51	64.81	70.22	67.51	2.71
370Z	67.25	67.25	67.25	67.25	0.00
204Z	67.18	67.18	67.18	67.18	0.00
195Z	65.05	70.87	65.05	66.99	3.36
360Z	65.10	67.79	67.79	66.89	1.55
351Z	67.57	64.86	67.57	66.67	1.56
359Z	59.73	67.79	70.47	66.00	5.59
379Z	65.10	65.10	67.79	66.00	1.55
299Z	67.51	64.81	64.81	65.71	1.56
371Z	65.10	65.10	65.10	65.10	0.00
256Z	67.57	62.58	65.07	65.07	2.49

223Z	67.96	62.14	65.05	65.05	2.91
264Z	67.57	64.86	62.16	64.86	2.70
358Z	65.10	59.73	67.79	64.21	4.10
390Z	53.22	71.93	67.25	64.13	9.74
196Z	65.05	62.14	65.05	64.08	1.68
365Z	64.44	61.71	64.44	63.53	1.58
364Z	65.05	59.22	65.05	63.11	3.36
314Z	64.63	61.90	61.90	62.81	1.57
262Z	64.06	58.53	64.06	62.21	3.19
199Z;248Z	61.90	59.18	61.90	61.00	1.57
383.1z	59.73	62.42	59.73	60.63	1.55
384Z	58.52	64.44	58.52	60.49	3.42
378Z	59.46	59.46	62.16	60.36	1.56
225Z	62.14	59.22	59.22	60.19	1.68
368Z	61.48	58.52	58.52	59.51	1.71
330Z	53.00	55.76	64.06	57.60	5.76
237Z	57.59	57.59	57.59	57.59	0.00
355Z	57.05	57.05	57.05	57.05	0.00
231Z	59.18	56.46	53.74	56.46	2.72
251Z	56.46	53.74	56.46	55.56	1.57
389Z	58.52	55.56	52.59	55.56	2.96
385Z	53.50	54.87	56.24	54.87	1.93
367Z	52.59	55.56	55.56	54.57	1.71
282Z	58.53	53.00	50.23	53.92	4.22
382.1Z	53.22	53.22	50.88	52.44	1.35
246Z	40.54	67.57	48.65	52.25	13.87
383Z	48.03	53.50	50.77	50.77	2.74

201Z	53.40	50.49	47.57	50.49	2.91
198Z	44.70	53.00	53.00	50.23	4.79
374z	51.68	46.31	51.68	49.89	3.10
315Z	45.58	42.86	45.58	44.67	1.57
232Z	48.30	37.41	45.58	43.76	5.66
342Z	40.94	43.62	40.94	41.83	1.55
331Z	37.09	42.56	39.83	39.83	3.87
323Z	37.41	37.41	37.41	37.41	0.00
193Z	30.10	35.92	44.66	36.89	7.33
203Z	41.75	38.83	30.10	36.89	6.06
346Z	45.30	26.15	37.09	36.18	9.61
224Z	41.75	41.75	15.53	33.01	15.13
211Z	33.64	28.11	30.88	30.88	2.76
226Z	-9.40	-12.14	100.00	26.15	63.97
259Z	11.11	28.89	2.22	14.07	13.58
245Z	13.51	5.41	5.41	8.11	4.68
377Z	0.00	5.41	5.41	3.60	3.12
213Z	-2.70	5.41	2.70	1.80	4.13
372Z	-8.11	5.41	8.11	1.80	8.69
301Z	-0.17	-5.58	-2.88	-2.88	2.71
240z	-10.09	-10.09	3.67	-5.50	7.95
247Z	-6.67	-6.67	-3.93	-5.75	1.58
356Z	-10.07	-4.70	-4.70	-6.49	3.10
376Z	-7.38	-10.07	-7.38	-8.28	1.55
316Z	-17.01	-14.29	-11.56	-14.29	2.72
233Z	-16.13	-10.60	-18.89	-15.21	4.22
197Z	-19.42	-16.50	-16.50	-17.48	1.68

Anexo 4

Tabla 9 Datos de la Fusariosis de cada planta evaluada en el ensayo in vivo obtenido mediante ImageJ.*Transformado: ASENS (RAIZ(Promedio /100))*

Bloque	Tratamiento	Réplica	IAN Promedio (%)	Transformado
Cama 1	C-	R1	0.00	0
Cama 1	C-	R2	0.00	0.00447215
Cama 1	C-	R3	0.12	0.03391815
Cama 1	C-	R4	0.06	0.02490237
Cama 1	C-	R5	0.00	0
Cama 2	C-	R6	1.21	0.11022305
Cama 2	C-	R7	0.00	0
Cama 2	C-	R8	0.00	0
Cama 2	C-	R9	0.00	0
Cama 2	C-	R10	0.00	0
Cama 1	T1	R1	9.83	0.31885603
Cama 1	T1	R2	30.70	0.58721985
Cama 1	T1	R3	5.06	0.22693163
Cama 1	T1	R4	8.13	0.28908878
Cama 1	T1	R5	0.00	0
Cama 2	T1	R6	8.51	0.2960594
Cama 2	T1	R7	5.29	0.23216702
Cama 2	T1	R8	32.61	0.60775437
Cama 2	T1	R9	11.86	0.35150471
Cama 2	T1	R10	1.34	0.11588794
Cama 1	T2	R1	27.43	0.55124254
Cama 1	T2	R2	3.49	0.18791949

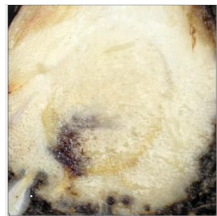
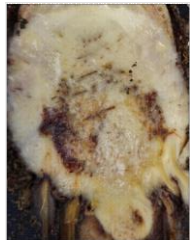
Cama 1	T2	R3	17.68	0.43400912
Cama 1	T2	R4	2.08	0.14486683
Cama 1	T2	R5	2.09	0.14518152
Cama 2	T2	R6	0.00	0
Cama 2	T2	R7	1.56	0.1250251
Cama 2	T2	R8	6.61	0.26009979
Cama 2	T2	R9	21.86	0.48647722
Cama 2	T2	R10	6.19	0.25152109
Cama 1	T3	R1	6.84	0.26451206
Cama 1	T3	R2	5.64	0.23966946
Cama 1	T3	R3	3.30	0.18270127
Cama 1	T3	R4	13.26	0.3726533
Cama 1	T3	R5	0.00	0
Cama 2	T3	R6	9.88	0.31972843
Cama 2	T3	R7	21.45	0.48152426
Cama 2	T3	R8	9.27	0.30929233
Cama 2	T3	R9	14.29	0.38767221
Cama 2	T3	R10	13.79	0.38038886
Cama 1	T4	R1	1.03	0.10186185
Cama 1	T4	R2	5.30	0.232234
Cama 1	T4	R3	17.86	0.43631117
Cama 1	T4	R4	3.49	0.18794673
Cama 1	T4	R5	17.50	0.43154015
Cama 2	T4	R6	2.52	0.15941948
Cama 2	T4	R7	15.60	0.40606096
Cama 2	T4	R8	18.08	0.4391763
Cama 2	T4	R9	32.61	0.60777571

Cama 2	T4	R10	0.00	0
Cama 1	T5	R1	7.24	0.27250703
Cama 1	T5	R2	0.42	0.06485286
Cama 1	T5	R3	11.60	0
Cama 1	T5	R4	0.00	0
Cama 1	T5	R5	0.00	0
Cama 2	T5	R6	0.00	0
Cama 2	T5	R7	31.27	0.59338314
Cama 2	T5	R8	0.00	0
Cama 2	T5	R9	8.05	0.28765838
Cama 2	T5	R10	12.57	0.36242416
Cama 1	T6	R1	2.44	0.15668519
Cama 1	T6	R2	12.73	0.36484582
Cama 1	T6	R3	17.23	0.42808183
Cama 1	T6	R4	25.27	0.52667638
Cama 1	T6	R5	22.01	0.48835009
Cama 2	T6	R6	2.50	0.15878021
Cama 2	T6	R7	16.20	0.41423772
Cama 2	T6	R8	6.89	0.26561955
Cama 2	T6	R9	10.50	0.33004259
Cama 2	T6	R10	6.81	0.26391703
Cama 1	T7	R1	0.83	0.09134099
Cama 1	T7	R2	1.70	0.13075632
Cama 1	T7	R3	9.44	0.31236591
Cama 1	T7	R4	9.41	0.31173275
Cama 1	T7	R5	0.00	0
Cama 2	T7	R6	20.95	0.47546891

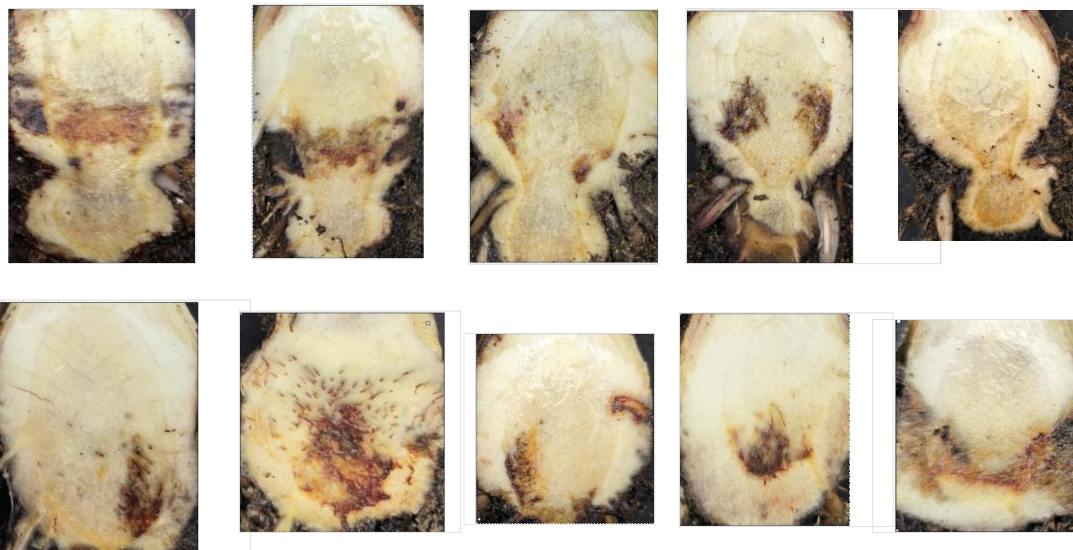
Cama 2	T7	R7	0.00	0
Cama 2	T7	R8	0.00	0
Cama 2	T7	R9	0.93	0.09637803
Cama 2	T7	R10	1.34	0.11588794
Cama 1	T8	R1	2.32	0.15301026
Cama 1	T8	R2	10.73	0.33377559
Cama 1	T8	R3	0.60	0.07753734
Cama 1	T8	R4	2.21	0.14928178
Cama 1	T8	R5		
Cama 2	T8	R6	26.14	0.34481616
Cama 2	T8	R7	11.43	0.47415311
Cama 2	T8	R8	20.85	0.2230229
Cama 2	T8	R9	4.89	0.55095113
Cama 2	T8	R10	27.41	0.17038141
Cama 1	C+	R1	2.88	0.17038141
Cama 1	C+	R2	4.42	0.21174536
Cama 1	C+	R3	3.98	0.20077025
Cama 1	C+	R4	4.92	0.22355545
Cama 1	C+	R5	3.44	0.18641533
Cama 2	C+	R6	4.80	0.22078713
Cama 2	C+	R7	27.36	0.5504802
Cama 2	C+	R8	34.10	0.623578
Cama 2	C+	R9	10.05	0.32251644
Cama 2	C+	R10	70.27	0.99406259

Anexo 5

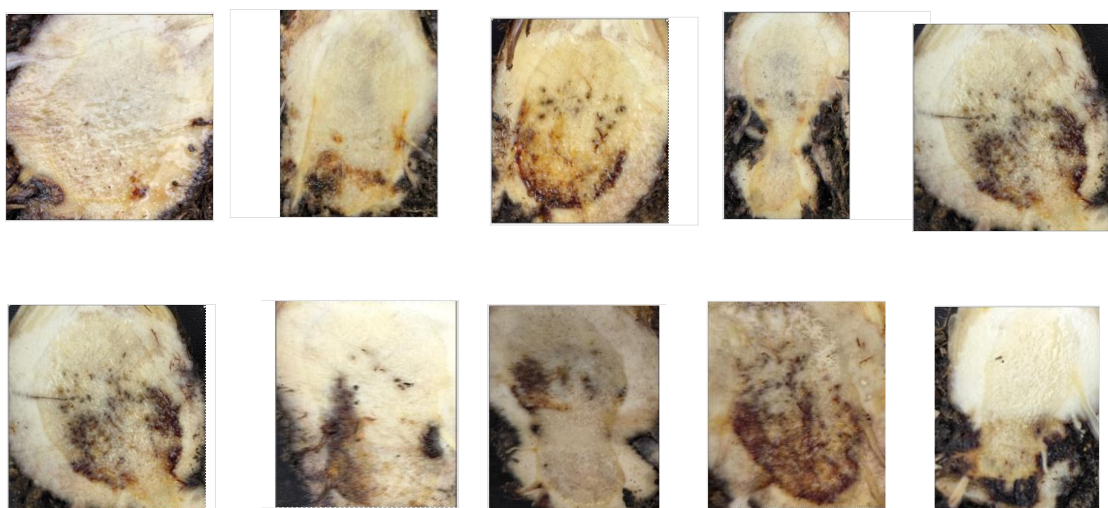
Tabla 10 Fotos del rizoma de los tratamientos y controles evaluados

Tratamiento					
T1					
					
					
					

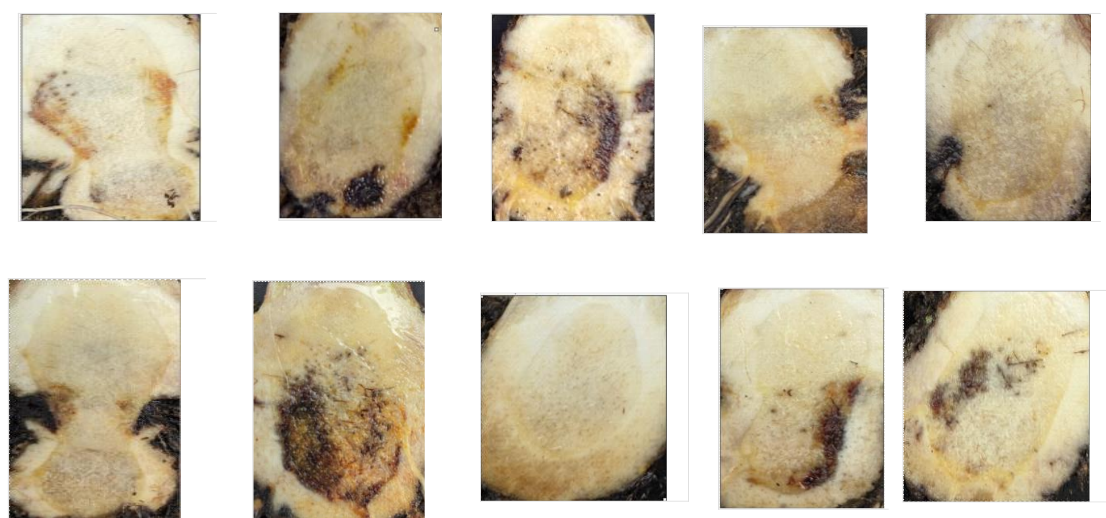
T3



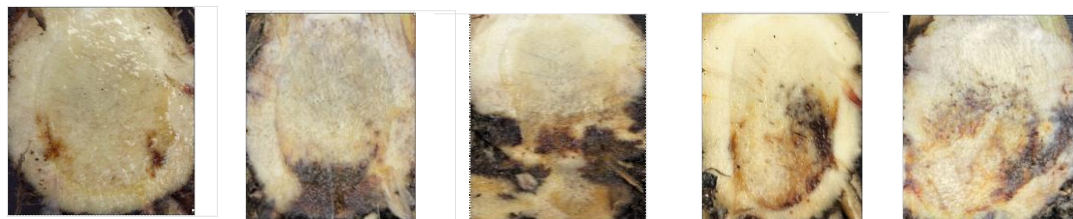
T4



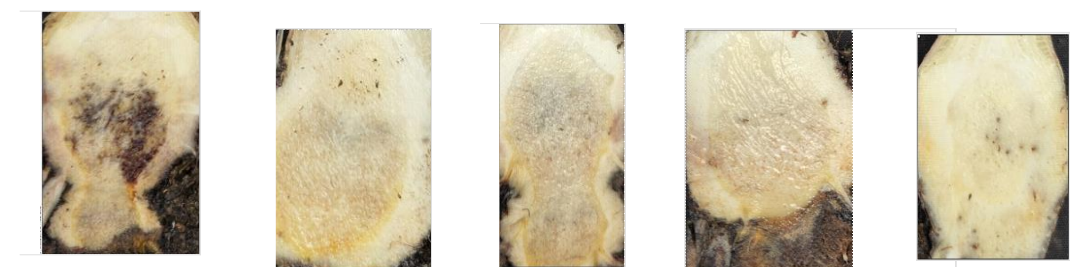
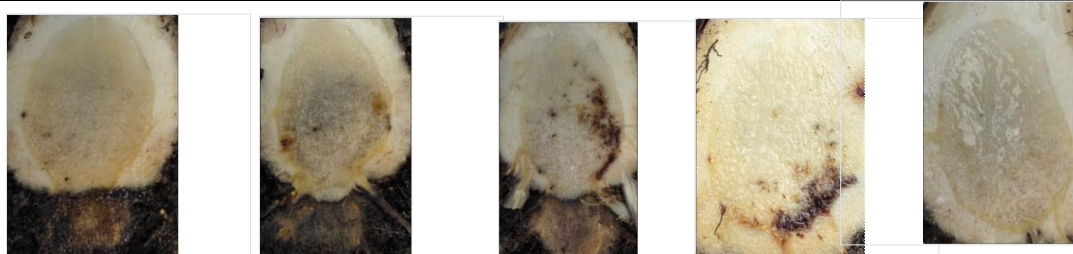
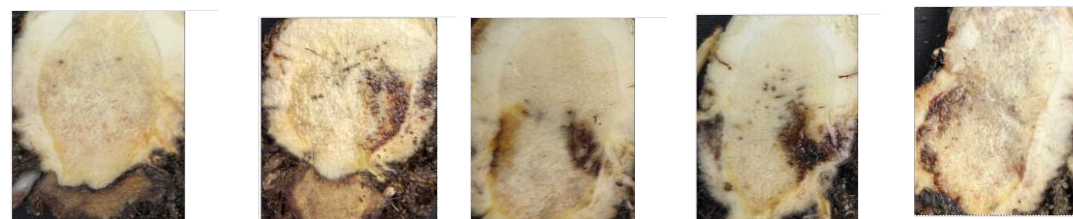
T5



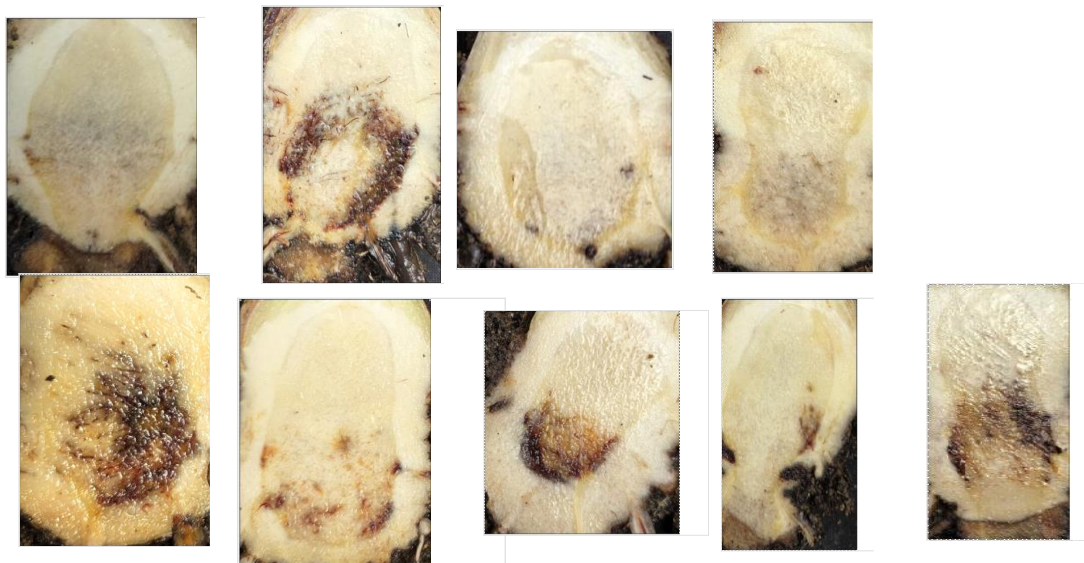
T6



T7



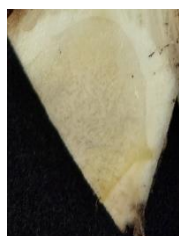
T8



C+

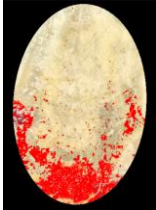
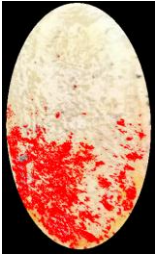
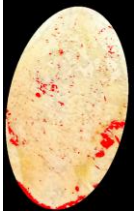
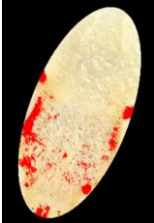
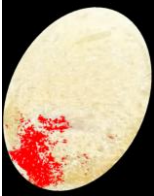
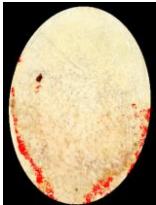
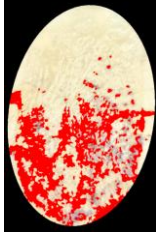
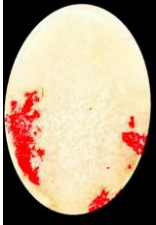
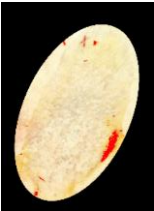
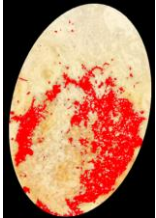
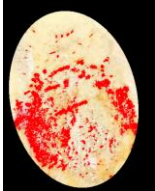
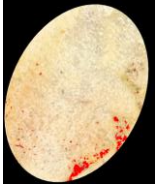
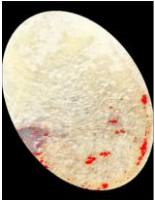
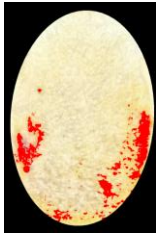
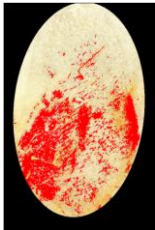
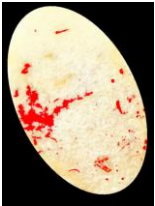
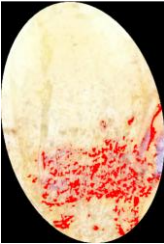
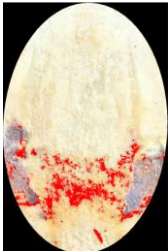
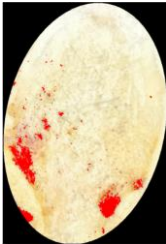
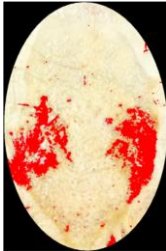


C-



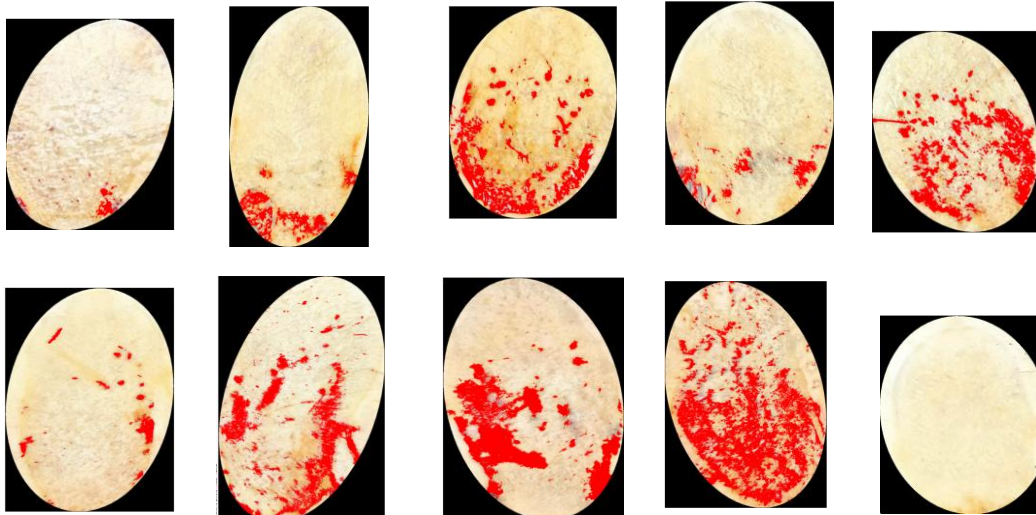
Anexo 6

Tabla 11 *Análisis del porcentaje de área necrosada del rizoma utilizando la herramienta ImageJ*

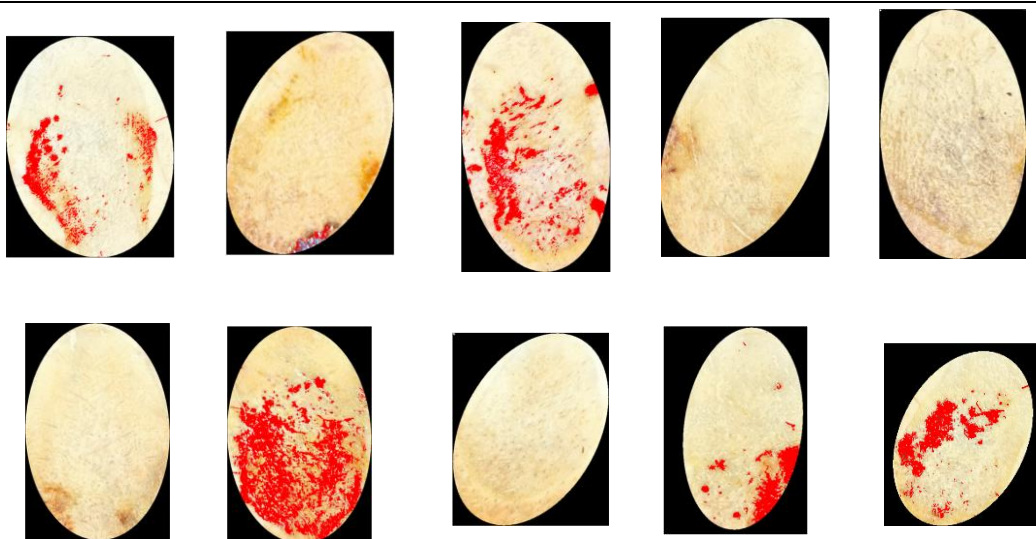
Tratamiento					
T1					
					
T2					
					
T3					



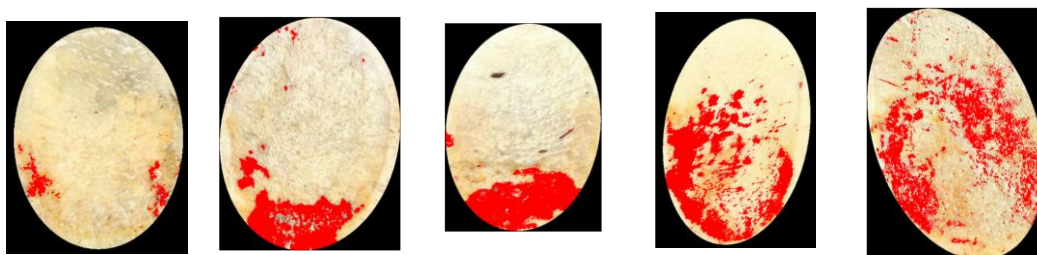
T4

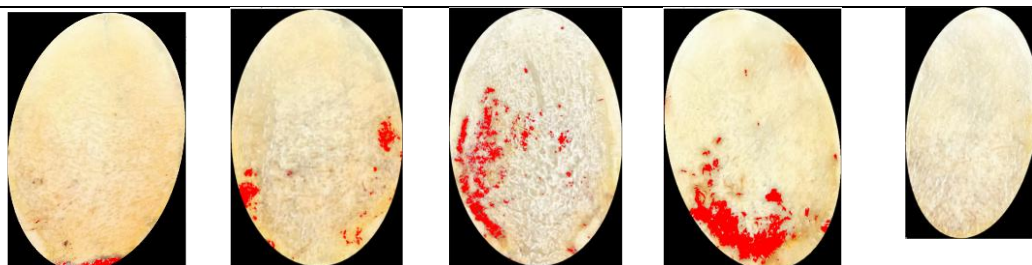


T5

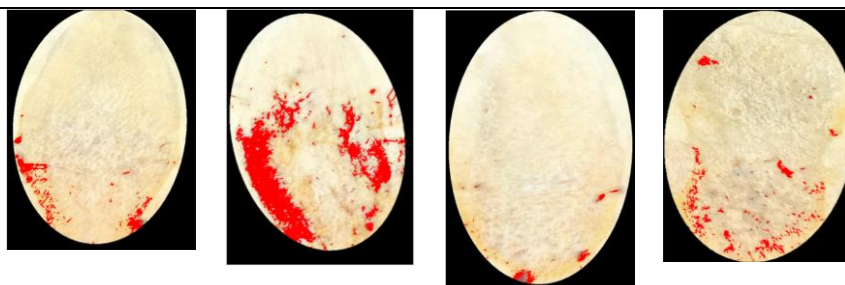
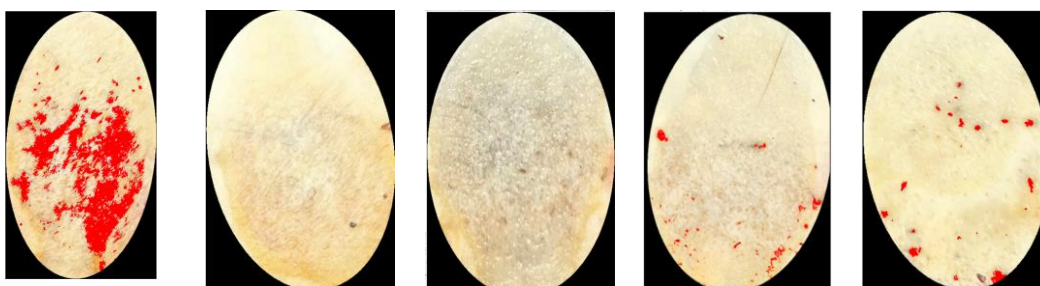


T6





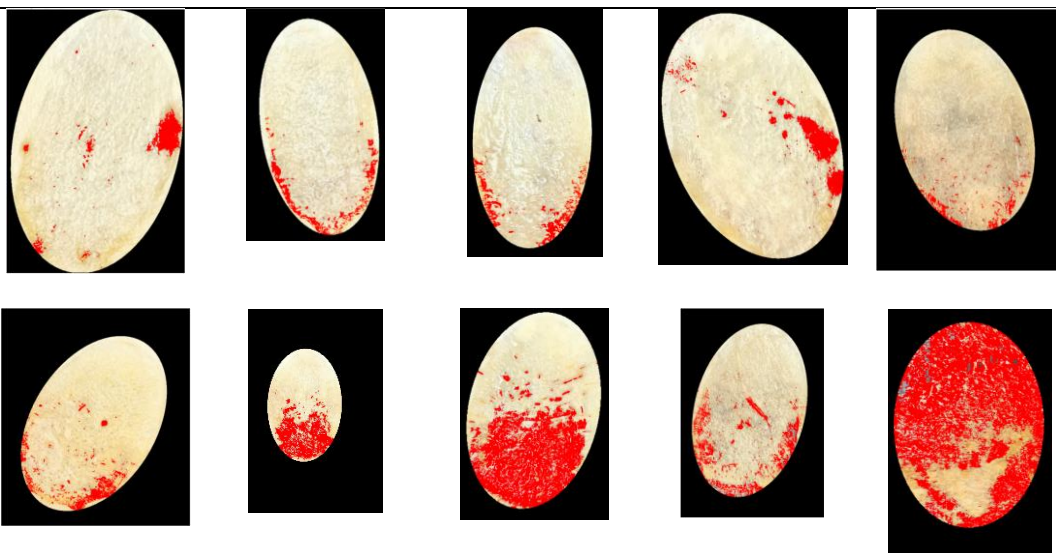
T7



T8



C+



C-

