

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFUNGICIDA DE LAS SETAS MEDICINALES Y
COMESTIBLES *Ganoderma lucidum* & *Pleurotus ostreatus* SOBRE *Pseudocercospora fijiensis*
Morelet, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA EN CULTIVOS DE BANANO

Autor: Restrepo Restrepo Yenny Paola

Asesores: Sepúlveda Arango Liuda Johana
Atehorúa Garcés Lucía

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Instituto de Biología
Medellín
2020

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFUNGICIDA DE LAS SETAS MEDICINALES Y
COMESTIBLES *Ganoderma lucidum* & *Pleurotus ostreatus* SOBRE *Pseudocercospora fijiensis*
Morelet, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA EN CULTIVOS DE BANANO

Yenny Paola Restrepo Restrepo

Trabajo de Investigación para optar al título de Bióloga

Asesoras

Liuda Johana Sepúlveda Arango, Q.F., M. Sc., Ph.D.

Lucía Atehorúa Garcés, Ph.D.

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Instituto de Biología
Medellín
2020

TABLA DE CONTENIDO

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFUNGICIDA DE LAS SETAS MEDICINALES Y COMESTIBLES <i>Ganoderma lucidum</i> & <i>Pleurotus ostreatus</i> SOBRE <i>Pseudocercospora fijiensis</i> Morelet, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA EN CULTIVOS DE BANANO	2
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE GRÁFICOS.....	7
LISTA DE ANEXOS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	7
EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFUNGICIDA DE LAS SETAS MEDICINALES Y COMESTIBLES <i>Ganoderma lucidum</i> & <i>Pleurotus ostreatus</i> SOBRE <i>Pseudocercospora fijiensis</i> Morelet, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA EN CULTIVOS DE BANANO	8
RESUMEN.....	8
Palabras Clave: Biocontrol – <i>Pleurotus ostreatus</i> – Ácidos Ganodéricos – Triterpenos – <i>Ganoderma lucidum</i> – <i>Musa</i> sp. – <i>Pseudocercospora fijiensis</i> – Actividad Antifúngica.....	8
INTRODUCCIÓN	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
OBJETIVOS (GENERAL Y ESPECÍFICOS)	13
General:.....	13
Específicos.....	13
MARCO TEÓRICO	14
Importancia nutricional y económica del cultivo de banano	14
Dificultades en el cultivo de banano, uno de los mayores problemas: Sigatoka negra.....	15
• Control por agentes químicos.....	17
• Manejo en campo prácticas culturales	19
• En búsqueda de alternativas.....	19
• Casos puntuales... <i>Ganoderma lucidum</i> & <i>Pleurotus ostreatus</i>	21
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Obtención de cultivos monospóricos de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	23
1.1 Descripción microscópica de las ascosporas.	23
1.2 Descripción macroscópica de las colonias.....	23
1.3 Siembra a profundidad de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>	23
2. Obtención de las cepas R1 de los hongos comestibles y medicinales <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>	24

3. Fermentación en estado líquido (FEL) o cultivo sumergido de <i>Ganoderma lucidum</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>.	24
3.1 Cultivos sumergidos a escala de 1000mL.	24
3.2 Cultivos sumergidos en diferentes fuentes de Carbono (no convencionales).	24
4..... Ensayos de antagonismo por los métodos de siembra a profundidad y enfrentamiento dual.	25
4.1 Antagonismo a profundidad de <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i> sobre <i>P. fijiensis</i>	25
4.2 Antagonismo dual de <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i> sobre <i>P. fijiensis</i>	25
5. Inmovilización de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> en esferas de alginato de sodio en cocultivo con <i>Ganoderma lucidum</i> & <i>Pleurotus ostreatus</i>.	26
5.1 Procesamiento medios extracelulares e intracelulares de las cepas trabajadas.	26
5.1.1 Medios Intracelulares	26
5.1.2 Medios Extracelulares	26
6. Ensayos de actividad antifúngica de las matrices metabólicas de ambas cepas medicinales por el método de microdiluciones en microplatos de 96 pozos.	27
6.1 Preparación del inóculo	27
6.2 La extracción de proteínas se realizó con base al siguiente protocolo:.....	28
6.3 Extracción polisacáridos de <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i>	28
6.3.1 Extracción Intrapolisacáridos	28
6.3.2 Extracción Exopolisacáridos.....	28
6.4 Extracción de los triterpenos totales de <i>P. ostreatus</i> & <i>G. lucidum</i>	29
6.5 Extracción ácidos ganodéricos.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
1. Cultivos monospóricos de <i>Pseudocercospora fijiensis</i>.	31
1.1 Descripción microscópica de <i>P. fijiensis</i>	31
1.2 Descripción macroscópica de <i>P. fijiensis</i>	31
2. Mantenimiento de cepas medicinales <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i> en Agar BIO-VEG.	32
3. Fermentación en estado líquido (FEL) de <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i>.	32
3.2 Cultivos sumergidos en diferentes fuentes de carbono.	33
4..... Ensayos de antagonismo por los métodos de siembra a profundidad y enfrentamiento dual.	34
4.1 Antagonismo en siembra a profundidad.	34
4.2 Antagonismo Dual	35
5. Evaluación de la actividad antifúngica de co-cultivos en medio sumergido de las setas medicinales vs <i>P. fijiensis</i> inmovilizado en perlas de alginato de sodio.	39
5.1 Actividad antifúngica de los medios intracelulares y extracelulares de <i>G. lucidum</i>	40

5.1.1 Actividad antifúngica de los medios intracelulares	40
5.1.2 Actividad antifúngica de los medios extracelulares.....	40
6. Evaluación de la actividad antifúngica de los metabolitos primarios: Extractos proteicos, Exopolisacáridos e Intrapolisacáridos de <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i>	41
6.2 Actividad antifúngica de los extractos proteicos	41
6.3 Actividad antifúngica de los Intrapolisacáridos y exopolisácaridos.....	41
6.4 Actividad antifúngica de los extractos orgánicos tipo triterpenoides de <i>P. ostreatus</i> ..	42
6.5 Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de <i>G. lucidum</i>	43
CONCLUSIONES	45
PERSPETIVAS.....	46
AGRADECIMIENTOS	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>P. fijiensis</i> expuesto a los medios intracelulares y extracelulares de <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i> recuperados de los co-cultivos inmovilizados con alginato de sodio.	39
Tabla 2: Concentraciones de los intrapolisacáridos y exopolisacáridos ensayadas para la evaluación de la actividad antifúngica en microplatos de 96 pozos de ambas cepas medicinales.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principales productores de banano en el mundo	14
Figura 2: Principales exportadores de Banano en el mundo.....	14
Figura 3: Principales Países importadores de Banano colombiano en el mundo	15
Figura 4: Ciclo de Vida de <i>P. fijiensis</i> en una planta de banano (<i>Musa sp.</i>).....	16
Figura 5: Diferentes estadios de Sigatoka negra en hojas de banano.....	17
Figura 6: Ensayo de antagonismo dual: <i>Pseudocercospora fijiensis</i> (colonia izquierda) y <i>Pleurotus ostreatus</i> (colonia derecha) en agar FC1 y PDAL respectivamente.....	25
Figura 7: Ascosporas de <i>P. fijiensis</i>	31
Figura 8: Cultivos de <i>P. fijiensis</i>	31
Figura 9: Cepas R1 en Agar FC1.	32
Figura 10: Seguimiento fotográfico en el tiempo de antagonismo por siembra a profundidad de <i>P. fijiensis</i> en Agar PDAL & Agar FC1. PO: <i>P. ostreatus</i> . GL: <i>G. lucidum</i>	34
Figura 11: Microfotografías antagonismo a profundidad.....	35
Figura 12: Seguimiento fotográfico en el tiempo de antagonismo dual en Agar FC1. GL: <i>G. lucidum</i> – PO: <i>P. ostreatus</i>	36
Figura 13: Seguimiento fotográfico en el tiempo de antagonismo dual en Agar PDAL. GL: <i>G. lucidum</i> & PO: <i>P. ostreatus</i>	37
Figura 14: Microfotografías antagonismo dual.	38
Figura 15: Efecto de las cepas medicinales sobre el crecimiento de <i>P. fijiensis</i> inmovilizados en esferas de alginato de sodio, en medio sumergido FC1.	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Producción de biomasa seca de <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i> obtenida de un medio sumergido.....	33
Gráfico 2: Producción de biomasa seca de <i>G. lucidum</i> obtenida de diferentes fuentes de carbono.....	33
Gráfico 3: Crecimiento de <i>P. fijiensis</i> en el tiempo Vs. <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i> en cultivos duales. Agar PDAL.....	37
Gráfico 4: Gráfico 6: Porcentaje de antagonismo ejercido por <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i> en enfrentamiento dual. Agar PDAL.....	37
Gráfico 5: Porcentaje de antagonismo ejercido por <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i> en enfrentamiento dual. Agar FC1.....	38
Gráfico 6: Crecimiento de <i>P. fijiensis</i> en el tiempo Vs. <i>G. lucidum</i> & <i>P. ostreatus</i> en cultivos duales. Agar FC1.....	38
Gráfico 7: Porcentaje de inhibición de los medios intracelulares de <i>G. lucidum</i> cultivado en diferentes fuentes cereales.....	40
Gráfico 8: Porcentaje de inhibición de los medios extracelulares de <i>G. lucidum</i> cultivado en diferentes fuentes cereales.....	40

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Grupos químicos y nombres comerciales reportados para el manejo de la Sigatoka negra.....	53
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOET: Acetato de Etilo
CH ₂ Cl ₂ : Diclorometano
CHCl ₃ : Cloroformo
ETOH: Etanol
FC: Fuente de Carbono
FEL: Fermentación en estado líquido
GL: <i>Ganoderma lucidum</i>
H ₂ O: Agua
HCl: Ácido Clorhídrico
KOH: Hidróxido de Potasio
MeOH: Metanol
NaHCO ₃ : Bicarbonato de Sodio
OD: Densidad Óptica
PDAL: Agar PDA enriquecido con hojas de banano
PO: <i>Pleurotus ostreatus</i>

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFUNGICIDA DE LAS SETAS MEDICINALES Y COMESTIBLES *Ganoderma lucidum* & *Pleurotus ostreatus* SOBRE *Pseudocercospora fijiensis* Morelet, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA EN CULTIVOS DE BANANO

RESUMEN

El banano es una de las frutas más apetecidas y consumidos a nivel mundial, pero su cultivo se ha visto gravemente afectado por diferentes enfermedades, dentro de las que se destaca la sigatoka negra, ocasionada por el hongo ascomycete *Pseudocercospora fijiensis*, el causa enormes pérdidas a los productores debido a la maduración prematura de sus frutos y a la calidad de mismo. El manejo de la enfermedad ha estado permeado por el uso intensivo de fungicidas químicos, que han ocasionado en *P. fijiensis* una fuerte resistencia a estos. El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial biofungicida de las setas medicinales y comestibles *Ganoderma lucidum* & *Pleurotus ostreatus* sobre *Pseudocercospora fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra en cultivos de banano. Nuestros resultados sugieren que *G. lucidum*, es la mejor seta medicinal para inhibir el desarrollo micelial de *P. fijiensis* a nivel *in-vitro*, además se encontró que los medios extracelulares e intracelulares de la cepa medicinal anteriormente mencionada, presentaron actividad antifúngica por lo cual creemos que en estos medios hay otros compuestos como enzimas y/o péptidos capaces de inhibir el desarrollo de *P. fijiensis*. Por otro lado se encontró que los extractos ricos en ácidos ganodéricos a una concentración de 300ppm tienen un fuerte efecto para inhibir el desarrollo micelial del patógeno en ensayos de microdiluciones realizado en microplatos de 96 pozos, por lo cual se sugiere realizar una caracterización de este extracto con el fin de dilucidar las moléculas responsables de la actividad antifúngica reportada en este estudio.

Palabras Clave: Biocontrol – *Pleurotus ostreatus* – Ácidos Ganodéricos – Triterpenos – *Ganoderma lucidum* – *Musa* sp. – *Pseudocercospora fijiensis* – Actividad Antifúngica.

INTRODUCCIÓN

El banano (*Musa paradisiaca*) es una de las frutas más demandadas a nivel mundial, y según datos de exportación, para el año 2019 se exportaron alrededor de 20.2 millones de toneladas, reportándose un incremento del 5% en las exportaciones comparado con el año inmediatamente anterior (FAO 2020). Lo anterior implicó que el número de exportaciones en Latinoamérica también aumentara; y Colombia siendo unos de los principales exportadores junto a Ecuador y Costa Rica, siguió la misma tendencia, produciendo para el año 2018 unas 2'083.141,66 toneladas de banano, en un área de 83.724,66 ha (Minagricultura 2018).

La alta demanda de esta fruta ha colocado en aprieto a los productores del país, ya que se evidencia una alta incidencia de enfermedades como sigatoka negra, sigatoka amarilla, moko, mal de panamá, nemátodos y sinfilidos, que influyen negativamente en el rendimiento de los cultivos. Para nuestro caso particular, la sigatoka negra es causada por el hongo ascomycete *Pseudocercospora fijiensis*. Esta enfermedad afecta de manera específica la zona foliar de la planta, disminuyendo el número de hojas funcionales lo que ocasiona la producción de racimos más pequeños y con maduración prematura (Agrios 2005).

La sigatoka negra (*P. fijiensis*) es manejada principalmente con fungicidas químicos que además de ser costosos, han ocasionado que las poblaciones de *P. fijiensis* adquieran resistencia contra los fungicidas sistémicos comúnmente utilizados, lo que ha llevado a los productores a aumentar las dosis y frecuencias de aplicación (Corrales et al. 2002; Etebu and Young-harry 2011). Otra forma de manejar la enfermedad se basa en las prácticas culturales, cuyo propósito es mantener condiciones adversas para el desarrollo de la enfermedad y que por el contrario favorezcan el correcto desarrollo del cultivo; las prácticas que más se destacan son el deshoje, deshije y la fertilización adecuada.

Debido a la alta incidencia de la sigatoka negra en los cultivos de banano del país, se requiere de soluciones amigables con el ambiente y que no generen los inconvenientes anteriormente citados. En consecuencia, varias investigaciones en diversas partes del mundo han estado dirigidas a la búsqueda de organismos y/o sus componentes, incluyendo principalmente bacterias, hongos y extractos vegetales, que posean capacidad biocontroladora contra organismos fitopatógenos. Se ha reportado que el género de hongos *Trichoderma* sp. (Alvindia 2012), y los géneros de las bacterias *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. (Shoda 2000; Alvindia 2012); extractos vegetales de *Cinnamomun eylanicum* (canela) y *Piper betel* (pimienta india) (Alvindia 2012), pueden inhibir el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos como *F. oxysporum* y *P. fijiensis*. Aunque se han obtenido resultados esperanzadores con el uso de microorganismos como hongos y bacterias, su aplicación tiene la desventaja que una vez son liberados al ambiente, pueden comportarse de manera invasiva, afectando la composición de la microbiota nativa del suelo. Por otra parte, estos microorganismos dependen de la capacidad para adaptarse a ese nuevo nicho y por ende no inician de inmediato la síntesis y secreción de enzimas líticas asociadas a su acción biocontroladora. Adicionalmente, estos microorganismos pueden ser removidos fácilmente del ambiente debido a la constante aplicación de moléculas químicas para el manejo de arvenses y la fertilización del suelo (Greathead & Waage 1983; Patiño et al. 2007).

Teniendo en cuenta los anteriores antecedentes, urge implementar nuevas estrategias de biocontrol costo-efectivas, que constituyan nuevas alternativas para el manejo de la Sigatoka negra en campo. Para lo cual, se requiere de un mayor número investigaciones basadas en la química verde, con el fin de elucidar cuales son los mecanismos, las moléculas o metabolitos

implicados en el antagonismo observado, y como pueden estos ser formulados para el manejo de la Sigatoka negra en los cultivos de banano.

En la búsqueda de alternativas para combatir la problemática creciente que representa la Sigatoka negra en el país, el grupo de Biotecnología de la Universidad de Antioquia ha trabajado conjuntamente de la mano de la Asociación de Bananeros de Colombia -AUGURA- en la búsqueda de biomoléculas con actividad antifúngica, biosintetizadas por hongos comestibles y medicinales como *G. lucidum* & *P. ostreatus*, los cuales han demostrado una actividad antagónica *in-vitro* hacia *P. fijiensis*. La presente investigación incluye los resultados experimentales obtenidos de un trabajo direccionado a la búsqueda de las moléculas responsables de la actividad antagónica, observada a nivel *in-vitro* en ensayos de enfrentamiento dual, siembra a profundidad y co-cultivos en medio sumergido con los macromicetos anteriormente nombrados vs el hongo fitopatógeno. En primer lugar, se evaluó la actividad antifúngica *in-vitro* de los medios extracelulares e intracelulares obtenidos a partir de la fermentación en estado líquido de *G. lucidum* & *P. ostreatus*. Adicionalmente, se evaluó la actividad antifúngica de biopolímeros tipo intra y exopolisacáridos, proteínas y extractos triterpénicos comúnmente asociados a la actividad terapéutica de estos macromicetos. A partir de los resultados obtenidos pudo demostrarse que los medios extracelulares e intracelulares de *G. lucidum* presentan una actividad antifúngica entre el 70 – 90% sobre *P. fijiensis*. Entre las diferentes matrices probadas, los extractos orgánicos correspondientes a la fracción triterpenoide rica en ácidos ganodéricos, presentó una alta capacidad inhibitoria del crecimiento de *P. fijiensis* a una concentración de 300ppm. Relacionado con la actividad antifúngica de *P. ostreatus*, sus polisacáridos, proteínas, y las fracciones triterpenoides no presentaron actividad antifúngica significativa.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Constituyen las matrices metabólicas de *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus ostreatus* una alternativa para el biocontrol de *Pseudocercospora fijiensis*, agente causal de la sigatoka negra a nivel *in-vitro*?

El banano es uno de los productos alimenticios más apetecidos a nivel mundial, con más de 145.000.000 de toneladas producidas por año y es cultivado en más de 130 países tanto tropicales, como subtropicales (Churchill 2011; Ploetz 2015); también es el cuarto cultivo económicamente más importante, después del arroz, trigo y maíz; ayudando así al desarrollo de la economía de muchos países con bajos ingresos e incluso con un déficit de alimentos (Ecuador, Colombia, Honduras, Guatemala, Camerún, Costa de Marfil y Filipinas) (citado por Zapata (2010) de FAO 2011b). La producción de banano en Colombia para el año 2018 alcanzó la cifra de 2'068.833 toneladas (103,4 millones de cajas de 20 kilos aproximadamente) y cerca del 60% de esta producción fue proporcionada por el departamento de Antioquia con un poco más de 1'246.203 ton, para la exportación y el consumo local (Minagricultura 2018).

Las enfermedades asociadas a los cultivos de banano en Colombia y el mundo tales como sigatoka negra, mal de Panamá, moco, y plagas como los nemátodos, picudos y sinfílicos, se han convertido en un enorme obstáculo para la comercialización debido a los altos contenidos de agroquímicos residuales en la fruta, lo cual impacta de manera negativamente la calidad de la fruta, y genera rechazo por parte de los gremios importadores. Adicionalmente, se ha reportado que las plantas han adquirido resistencia a los pesticidas utilizados comúnmente, lo que ha llevado a los cultivadores a incrementar las dosis y frecuencias de aplicación, por lo cual se ha generado una cantidad de efectos secundarios que no sólo involucran la salud humana, sino la del ambiente (Osorio-Salamanca 2006; Moreno Pérez et al. 2016). Otro punto importante a considerar sobre el control químico es que la fertilidad del suelo también se ha visto gravemente afectada, pues la constante aplicación de pesticidas y fertilizantes químicos, incrementan la concentración de fósforo soluble, la acidificación, la salinización y declinan la permeabilidad del suelo, disminuyendo la cantidad de materia orgánica disponible, afectando toda la biodiversidad asociada a la calidad de los suelos (FAO 2015; Elbehri et al. 2016).

El manejo químico empleado para controlar la enfermedad genera altos costos en la producción, siendo uno de los rubros más altos para la industria bananera y platanera, este puede constituir hasta un 27% del costo total de la producción, poniendo en desventaja a los pequeños y medianos productores que no cuentan con los recursos para financiar la compra y logística necesaria para la aplicación de estos productos. Los costos del manejo químico en las plantaciones están relacionados especialmente con la capacidad que tiene *P. fijiensis* de desarrollar resistencia a los fungicidas sistémicos (Etebu & Young-harry 2011), cuyo mecanismo de acción es más específico que el de los fungicidas protectantes. Lo anterior, ha contribuido a que los ciclos de rotación de los diferentes fungicidas químicos sean frecuentes o que se incrementen las dosis del producto en cada aplicación.

Debido a lo anterior, urge la investigación y el desarrollo de nuevas alternativas de biocontrol, como propuesta al mejoramiento de la productividad de los cultivos y de la seguridad alimentaria

y del ambiente (Osorio-Salamanca 2006). Es así como en los últimos años se ha realizado un esfuerzo inmenso para tratar de comprender la biología de las enfermedades e implementar nuevas metodologías, que permitan un manejo integrado de plagas y enfermedades, evitando así la dependencia de los pesticidas químicos y promoviendo el uso de metabolitos activos, obtenidos a partir de organismos vivos con capacidad antagónica como hongos, bacterias y plantas (Mosquera et al. 2009; Moreno Pérez et al. 2016).

El presente trabajo investigativo permitió evaluar la eficacia de los medios extracelulares e intracelulares, extractos proteicos, intra y exopolisacáridos, y extractos triterpénicos de los hongos *G. lucidum* y *P. ostreatus*, como agentes biocontroladores del hongo fitopatógeno *P. fijiensis*. Este estudio constituye una propuesta para la búsqueda e implementación de alternativas limpias de biocontrol que permitan un equilibrio con el ambiente, favorezcan la salud de los consumidores y estimulen el desarrollo económico en la región.

OBJETIVOS (GENERAL Y ESPECÍFICOS)

General:

- Investigar la capacidad antagónica de las setas medicinales *G. lucidum* & *P. ostreatus* y su relación con los diferentes tipos de metabolitos producidos durante la fermentación en estado líquido.

Específicos:

- Determinar la capacidad antagónica de las setas medicinales seleccionadas, utilizando diferentes metodologías (ensayos de antagonismo dual, siembra a profundidad, co-cultivo en medio líquido).
- Evaluar a nivel *in-vitro* la eficacia de diferentes matrices metabólicas (polisacáridos, proteínas, compuestos triterpenoides) obtenidas a partir del cultivo sumergido de *G. lucidum* & *P. ostreatus*, en el control del hongo fitopatógeno *P. fijiensis*.
- Analizar el efecto de las matrices metabólicas activas sobre el desarrollo y la morfología del hongo fitopatógeno a nivel microscópico.

MARCO TEÓRICO

Importancia nutricional y económica del cultivo de banano

El banano es uno de productos alimenticios más demandados y cultivados en el mundo, este es rico en carbohidratos, vitaminas (C, B1, B2 y B6), potasio (K) y magnesio (Mg); además es bajo en grasa, sodio y proteínas (Millán Cardona & Ciro Velásquez 2012). Este cultivo además de promover empleo local, aporta al crecimiento del PIB agrícola y genera divisas para los países en vías de desarrollo (Minagricultura 2018).

El comercio mundial del banano está dividido en dos grandes jerarquías: países productores y países exportadores (FAO 2018). Aunque la India y China (Fig.1), hacen parte de los principales productores de banano en el mundo, estos destinan la fruta cultivada para el consumo local, debido a la cantidad de población que ocupan sus territorios (3.287.263, 9.600.000 km², respectivamente); mientras que países como Ecuador, Colombia, Costa Rica, Guatemala y Filipinas (Fig.2), destinan una gran parte de su producción, para abastecer el mercado internacional (Elbehri et al. 2016).

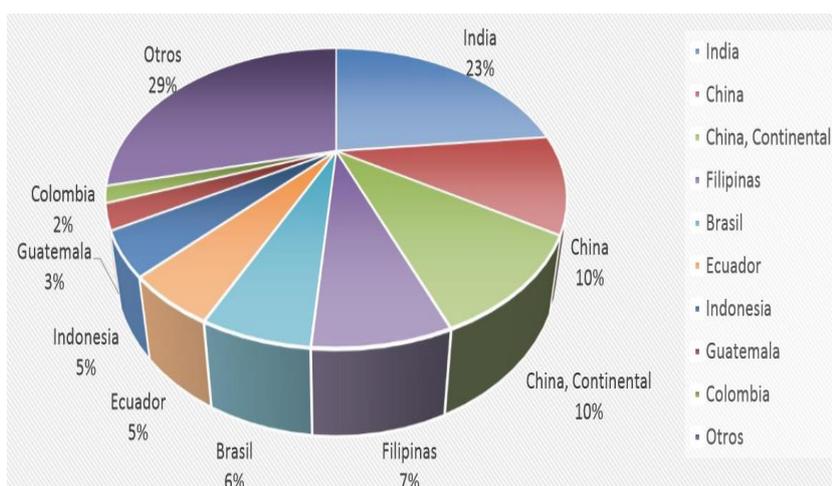


Figura 1: Principales productores de banano en el mundo (FAO 2017).

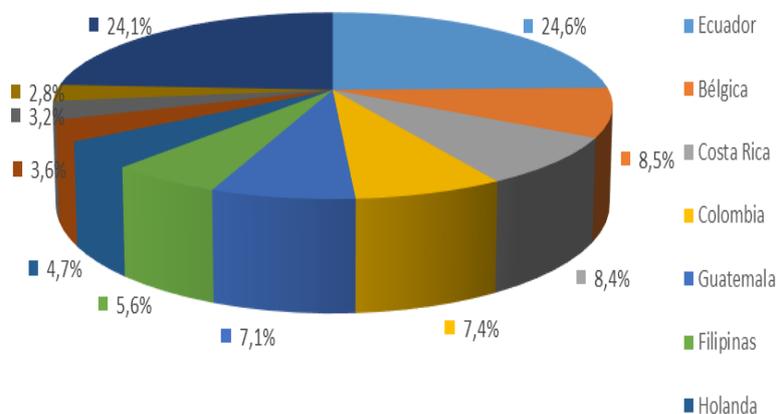


Figura 2: Principales exportadores de Banano en el mundo (FAO 2017).

Colombia produce banano tipo exportación (Cavendish) y banano criollo; este último tipo de banano es utilizado para la demanda interna y es cultivado principalmente en el Valle del Cauca, Tolima y Antioquia, aunque es más pequeño, este posee un mejor sabor (más dulce), mientras que el banano tipo Cavendish es de un tamaño mayor, y es comercializado en su mayoría para la demanda internacional; su producción está centrada en el Golfo de Urabá y en el Nororiente del Departamento del Magdalena.

Por otro lado, los principales países importadores de Banano Colombiano son Bélgica con 575.228 toneladas, lo que representa el 32%, es seguido por Estados Unidos quien importa cerca del 16% de la producción total del país, equivalente a unas 282.015 toneladas (Fig.3).

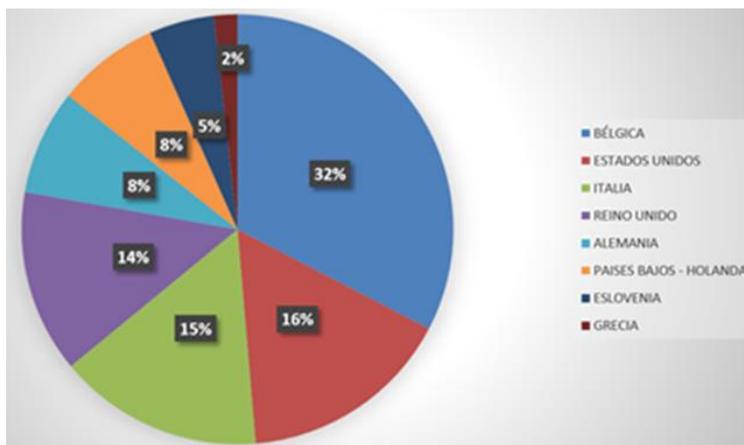


Figura 3: Principales Países importadores de Banano colombiano en el mundo (Minagricultura 2018).

Dificultades en el cultivo de banano, uno de los mayores problemas: Sigatoka negra

Si bien la producción de banano en Colombia ha estado al alza en los últimos años, la demanda a nivel internacional también sigue esta misma tendencia; no obstante, cabe resaltar que se han ido presentado dificultades a la hora de cumplir con los requisitos de inocuidad del producto, debido al manejo que se les da a las diferentes enfermedades con agentes químicos.

La sigatoka negra es una enfermedad causada por el hongo Ascomycete *P. fijiensis* M. Morelet forma asexual, heterotálica que en su estado sexual es *Mycosphaerella fijiensis* (M. Morelet) (Deighton 1976). Este hongo es un haploide hemibiotrófico; que se nutre de forma biótrofa y necrófaga, se encuentra clasificado dentro de la clase Dothideomycetes, orden Capnodiales y familia Mycosphaerellaceae. *P. fijiensis*, es considerado la especie más devastadora del complejo llamado "Sigatoka Disease Complex", donde se encuentra *P. musicola*, agente causal de la sigatoka amarilla y el anamorfo *P. eumusae*, agente causal de la enfermedad de la mancha foliar en musáceas (Churchill 2011).

Esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas a los productores, pues esta tiende a disminuir el número de hojas y la cantidad de superficie foliar funcional de la planta, lo que impide el correcto desarrollo de los frutos, ocasionando una producción de bananos más pequeños, con desprendimiento del vástago (raquis del racimo) como consecuencia del maduración prematura (Agrios 2005).

El ciclo de vida de *P. fijiensis* como fitopatógeno de las musáceas, consta de cuatro etapas que incluyen la germinación de esporas, penetración del huésped en los espacios intracelulares de las células mesófilas sin formar haustorios, desarrollo de los síntomas y la producción de esporas (Fig.

4) (Agrios 2005). Este ciclo de la Sigatoka negra se manifiesta inicialmente con la fase asexual (*Pseudocercospora fijiensis* Morelet), cuando las hojas exhiben unas pequeñas manchas longitudinales de color amarillo, en las nervaduras laterales de las hojas, en las que se encuentran una baja cantidad de conidióforos que emergen de los estomas en el envés de la hoja (estos conidios abundan en las épocas de mayor pluviosidad) (Osorio-Salamanca 2006); pocos días después las manchas alcanzan una longitud de hasta 2cm y se tornan de color café (alta presencia de conidios) con centros de color gris claro, formando áreas muertas que se unen entre sí. Los conidios se producen en ambos lados de la hoja (adaxial y abaxial), pero la mayor cantidad se presentan en la parte adaxial; cuando la infección es severa las hojas pueden morir al cabo de pocas semanas (Agrios 2005). Luego la fase sexual es la más agresiva y compleja, y está determinada por la masiva producción de ascosporas, en los pseudotecios (manchas amarillas) (Mosquera et al. 2009); posteriormente estas ascosporas serán diseminadas por el viento alcanzando grandes distancias y germinarán gracias a la humedad proporcionada por el agua; mientras que los conidios serán diseminados localmente por el agua, los insectos y las herramientas de trabajo (Agrios 2005; Osorio-Salamanca 2006).



Figura 4: Ciclo de Vida de *P. fijiensis* en una planta de banano (*Musa* sp.) (Ilustración tomada de Agrios 2005).

Cuando las lesiones son observadas con más detalles, bajo microscopía de luz se puede evidenciar el deterioro inicialmente en el espacio aerífero en estadios tempranos de la enfermedad; luego las lesiones se extienden hacia las células parenquimáticas y haces vasculares, mientras que en los estadios finales el tejido de empalizada y la estructura de la hoja se pierden completamente. Bajo microscopía electrónica, se alcanza a percibir como las ascosporas o conidios del hongo *P. fijiensis*, germinan sobre los estomas de la hoja de banano, formando el micelio que los cubre totalmente (Zapata 2010). De manera macroscópica, se pueden evidenciar los diferentes estadios de la enfermedad que están definidos con base al porcentaje de área foliar afectada por el hongo *P. fijiensis*, de la siguiente manera: En el estadio 1, aparecen puntos pardos de 1 mm de diámetro en la hoja; en el estadio 2, se observan rayas de color pardo rojizo de 2 cm

de largo en el haz de la hoja; en el estadio 3, hay rayas de 3 cm de largo, visibles en el haz de la hoja; en el estadio 4, las manchas se unen y oscurecen hasta un color negro; en el estadio 5, las manchas negras aumentan de tamaño y adquieren una clorosis marcada alrededor de la zona afectada; en el estadio 6, finalmente, las zonas muertas y negras se secan y adquieren un color más pálido (Fig. 5) (Zapata 2010).

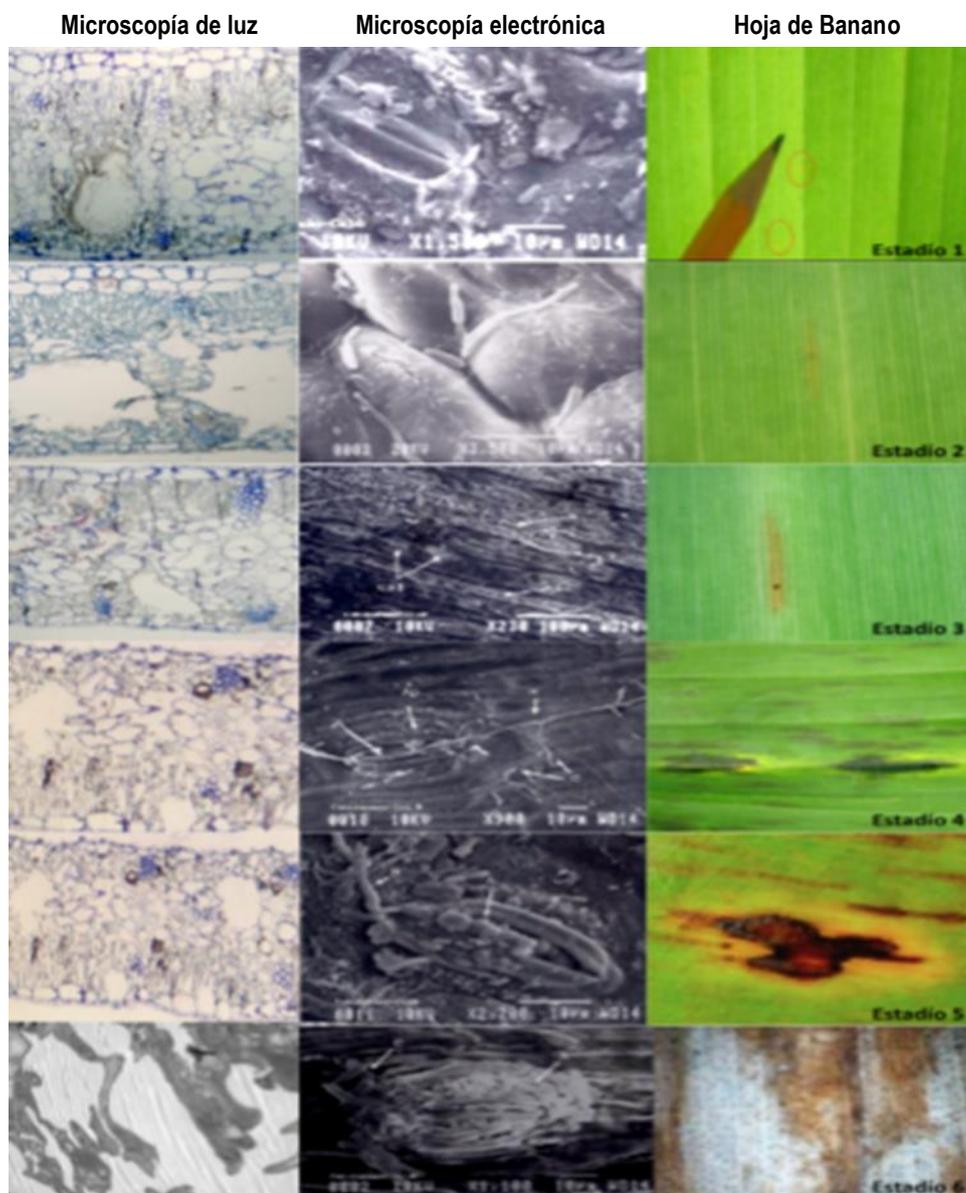


Figura 5: Diferentes estadios de Sigatoka negra en hojas de banano (Zapata 2010).

Medidas de control de la enfermedad

- **Control por agentes químicos**

La escasez de medidas eficaces para el manejo de la enfermedad en los cultivos de banano y plátano puede causar enormes pérdidas para los productores, pues hay una reducción de hasta un 50% del peso del racimo y un 100% de pérdidas en la producción debido al deterioro en la calidad de la fruta (longitud y grosor, maduración prematura y/o muerte de la planta.) lo anterior es consecuencia de la disminución de la capacidad fotosintética de las hojas, lo que impide que la energía captada por la planta no pueda ser utilizada en el correcto desarrollo de

los frutos (Churchill 2011). Además, se ha reportado que el costo total del control de la enfermedad, alcanza hasta un 27% de la producción total (Marín et al. 2003; Martínez et al. 2011), lo que conlleva a disminuir el número de predios empleados para la producción del banano y plátano (Mosquera et al. 2009).

De acuerdo al manejo de la enfermedad en campo, los agricultores han aplicado diferentes alternativas de control, para tratar de disminuir la incidencia de *P. fijiensis* en los cultivos de banano y plátano; entre ellos se destacan el uso excesivo de fungicidas químicos, sumado a el control cultural que consta de realizar una oportuna fertilización, deshojada y descolinada (Martínez et al. 2011). Sin embargo, el uso indiscriminado de los fungicidas, ha originado poblaciones de *P. fijiensis*, resistentes, por lo cual el control cada vez es menos eficiente y más costoso debido a las constantes aplicaciones que deben realizarse para controlar el patógeno (Chica et al. 2004; Martínez et al. 2011; Elbehri et al. 2016).

El control químico de la enfermedad se basa en utilizar dos tipos de fungicidas; los **protectantes**, que hacen parte del primer grupo de fungicidas creado y en ser utilizados en la protección de cultivos, se caracterizan por controlar solo los hongos que están establecidos fuera de los tejidos de la planta, ya que no tienen la capacidad de penetrar en estos. El otro grupo es conocido como fungicidas **sistémicos**, fueron desarrollados a finales de los 60's, y son preferidos por los agricultores, porque estos son capaces de penetrar los tejidos de la planta, y detener el crecimiento y desarrollo de los hongos patógenos (Marín et al. 2003).

Los grupos químicos utilizados para fabricar fungicidas que inhiben el desarrollo de *P. fijiensis*, en plantas de banano son (Pérez-Vicente 2013):

- **Inhibidores de la demetilación (DMIs):** responsables del bloqueo de la ruta de la biosíntesis del ergosterol (Propiconazole – Bitertanol - Prochloraz).
 - **Aminas:** Inhibidores de la síntesis de esteroides (Tridemorph).
 - **Inhibidores de Qo (Qols):** Inhibidores de la respiración mitocondrial por unión al sitio Qo del citocromo *b* (Azoxystrobin).
 - **Anilino pirimidinas (APs):** Inhibidores de la síntesis de metionina (Cyprodinil).
 - **Benzimidazoles (BCMs):** Inhibidores de la mitosis: Afecta específicamente el ensamblaje de los microtúbulos, debido a que se une a la principal proteína de los microtúbulos la β -tubulina (Benomyl - Cabendazim - Thiophanate).
 - **Fungicidas SDHI:** El blanco de los fungicidas SDHI es el complejo enzimático succinato deshidrogenasa (SDH) en la cadena respiratoria también conocido como complejo II o succinato ubiquinona oxidoreductasa (SQR), (Boscalid - Isopyrazam).
 - **Guanidinas:** Afectan de manera inespecífica la membrana celular (Gepp & Mondino 2000), (Dodine).
 - **Acción Multisitio:** Múltiples sitios de acción (Mancozeb®).
- Ver **Anexo1: Fungicidas.**

Así mismo las industrias encargadas de la producción de los fungicidas químicos, no han sido eficaces a la hora de emplear moléculas orgánicas, que sean idóneas para el control de la enfermedad y que no generen efectos adversos en el ecosistema; esta falencia de las industrias químicas ha generado graves problemas fitosanitarios y de salud pública como lo han reportado diferentes estudios (Varona et al. 2010; Varona-Urbe et al. 2012; Mena-espino and Couoh-Uicab 2015; Elbehri et al. 2016; Sivigila 2017).

- **Manejo en campo prácticas culturales**

El manejo de la enfermedad Sigatoka negra en campo, con base en prácticas culturales, está enmarcado en mantener los elementos necesarios para obtener el máximo rendimiento en los cultivos, pero que estos a su vez limiten la incidencia de la enfermedad, mediante la implementación de biofertilizantes a base de micorrizas, bacterias y la fertilización química a base de calcio, magnesio, nitrógeno y potasio (Orozco-Santos et al. 2008).

La eliminación de las hojas afectadas (deshoje) semanalmente constituye la práctica cultural más importante, ya que esta ayuda a reducir y/o eliminar la fuente principal de inóculo (hojas necrosadas y amarillas); así mismo la poda de los colinos, también ayudará a tener un cultivo más aireado y con menos humedad. El acopio de las hojas podadas y tratadas con urea y cal agrícola también ayudan a acelerar la descomposición del tejido vegetal y a evitar la esporulación del hongo fitopatógeno (Marín et al. 2003), también se pueden establecer zonas de compost dentro del cultivo, que permitan disminuir la fuente de inóculo y que luego podrían ser utilizadas como abono orgánico (Orozco-Santos et al. 2008).

Un buen sistema de drenaje es necesario en los cultivos para eliminar el exceso de humedad. Además la siembra en altas densidades, según Belalcázar-Carvajal (n.d.) aparte de duplicar el rendimiento del cultivo, genera una reducción significativa de la incidencia de la Sigatoka negra en las plantas, debido a que variables como la humedad relativa, la temperatura y baja cantidad de la luz limitan el desarrollo y la esporulación de *P. fijiensis*. Por otro lado, hacer una deshierba es muy positivo para las plantas de banano, ya que hay una mejor aireación dentro de las parcelas, y hay menos competencia por recursos como agua, nutrientes, espacio entre otras (Orozco-Santos et al. 2008).

- **En búsqueda de alternativas.**

Aunque hay diversas formas de control cultural, para disminuir la incidencia de *P. fijiensis* en campo, estas prácticas no son suficientes, ya que el aumento de la temperatura en los últimos años ha favorecido su desarrollo en diferentes latitudes y altitudes, así mismo la enfermedad se ha vuelto más agresiva, debido a resistencia adquirida por las constantes aplicaciones de los fungicidas químicos, aunado a lo anterior, se debe afirmar que cada zona o región bananera debe adoptar y adaptar un programa de prácticas culturales basado en el clima, la variedad cultivada de musáceas y el nivel severidad de la Sigatoka negra en estos cultivos; por lo cual es necesario, realizar más investigaciones, con el fin de obtener un protocolo efectivo que permita la incorporación tanto de las alternativas limpias de control como las prácticas culturales, contra las plagas y enfermedades que afectan los cultivos de banano (Orozco-Santos et al. 2008).

Es por esta razón que en los últimos años, se ha venido realizando un esfuerzo enorme por parte de investigadores, en países como Colombia, Costa Rica y México, para localizar y entender cómo es que los agentes de control biológico, actúan frente a un patógeno (Zapata 2010; Moreno Pérez et al. 2016), y como se puede utilizar ese conocimiento para ofrecer alternativas enmarcadas en la química verde, que permitan el manejo adecuado de las enfermedades, haciendo modelaciones a nivel *in-vitro* e *in-situ*. (Arzate-vega et al. 2006; Mosquera et al. 2009; Aristizabal 2011; Ceballos et al. 2012).

Las investigaciones hechas hasta el momento de control biológico en cultivos de musáceas, han sido dirigidas a enfermedades como Sigatoka negra (*P. fijiensis*), Sigatoka amarilla (*P. musicola*), Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum*), moco o marchitez bacterial (*Ralstonia solanaceum*), nemátodos (*Radopholus similis*) y picudo negro (*Rhynchophorus paglmarum*); que son las que más estragos han causado en la agricultura bananera de todo el mundo. Acorde a este tipo de investigaciones se están unificando los esfuerzos, para obtener las características deseadas de la fruta mediante la implementación de buenas prácticas agrícolas y un oportuno ejercicio de control biológico (Zapata 2010).

Como agentes de control biológico se ha propuesto el uso de macro y microorganismos o de sus componentes (enzimas, proteínas, metabolitos). Los organismos más utilizados en la búsqueda de agentes de control biológico, se destacan las bacterias, hongos y plantas; es el caso del género de hongos *Trichoderma* (Arzate-vega et al. 2006; Alwindia 2012), y de los géneros de las bacterias *Streptomyces* sp., *Bacillus* y *Pseudomonas* (Shoda 2000; Aristizabal 2011; Alwindia 2012); así mismo se han empleado extractos vegetales de *Cinnamomum eylanicum* (canela), *Piper betel* (pimienta india) (Alwindia 2012), de forma similar Mosquera y colaboradores (2009), evaluaron los extractos metanólicos de once familias de plantas, donde encontraron que la especie *Topobea discolor* perteneciente a la familia Melastomataceae, presentó la mayor actividad antagónica tanto en la fase sexual como asexual de *P. fijiensis*. Otra alternativa de control de enfermedades, no menos importante, ha sido la inducción de resistencia en cultivos, la cual consiste en el uso de moléculas exógenas (inductores), que son reconocidas por las moléculas endógenas de la planta, para fortalecer su propio mecanismo de resistencia, activando cascadas de señalización celular, que le permiten activar su mecanismo de defensa a nivel local o sistémico, para protegerse de un eventual ataque de hongos, bacterias, virus o nemátodos (Corrales et al. 2002; Marín et al. 2003).

En nuestro caso las investigaciones de control biológico para la Sigatoka negra (*P. fijiensis*) se han encontrado diversas alternativas de control con bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* y *Staphylococcus* (Ceballos 2009; Aristizabal 2011) también se han empleado hongos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, e *Hypocrea lixi*, (Arzate-vega et al. 2006; Moreno Pérez et al. 2016), muchos de estas se han aislado de la microbiota que posee la filósfera de los cultivos y que están asociados a estos de forma endófito o epifita. De igual manera se han utilizado extractos botánicos para el control de *P. fijiensis*, es el caso de las familias Annonaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Clusiaceae, Costaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Malvaceae, Melastomataceae, Moraceae, Passifloraceae, Piperaceae & Urticaceae, utilizadas para inhibir el desarrollo micelial y la germinación de ascosporas de *P. fijiensis*. (Osorio-Salamanca 2006; Mosquera et al. 2009).

Si bien estas investigaciones se han realizado *in-vitro* e *in-situ*, cabe aclarar que los bioensayos que se realizan en campo, dependen de la capacidad de los microorganismos para establecerse como parte de la microbiota epifita o endófito de la planta, y por lo cual, las especies pertenecientes al género *Bacillus*, exhiben una alta capacidad para adaptarse, ya que estas tienen la capacidad de formar endosporas que son resistentes a los rayos UV, y excretar una amplia gama de sustancias químicas con capacidad antimicrobiana (Shoda 2000; Patiño et al. 2007).

Conforme al uso de los microorganismos directamente en campo, no es muy recomendado debido a que estos se establecen en el ambiente, permitiéndoles competir por recursos

nutritivos y ambientales con la biota nativa del suelo, la endófito y la de la filósfera; además de esto, los microorganismos no inician de inmediato el empleo de enzimas líticas para controlar las enfermedades, lo cual genera una desaprobación por parte de los agricultores; en un mismo sentido los microorganismos también pueden ser fácilmente removidos del ambiente, por las constantes aplicaciones de moléculas químicas, para la fertilización y la remoción de enfermedades en los cultivos (Greathead & Waage 1983).

La búsqueda de nuevas alternativas menos invasivas en los ecosistemas, ha sido mediada por la investigación, desarrollo e innovación tecnológica de la **Química Verde**, esta filosofía promueve la obtención de biomoléculas a través de procesos de fermentación, construcción, expresión génica y análisis bioinformático, a partir de microorganismos y plantas, erradicando la problemática producida por el mal manejo dado a los agroquímicos en los cultivos, citado por Zapata (2010) de Ponsone et al. 2011; Fravel (2005).

- **Casos puntuales... *Ganoderma lucidum* & *Pleurotus ostreatus***

Entre tanto, *Ganoderma lucidum*, es un hongo basidiomicete, que hace parte del orden *Polyporales*, importantes en los ecosistemas naturales, ya que son descomponedores de madera, a su vez estos reciclan y liberan nutrientes que ayudan al mantenimiento de la estructura y función de los ecosistemas (Cepero de García et al. 2012). En un mismo sentido *G. lucidum*, pertenece a la familia Ganodermataceae que posee una amplia distribución en los trópicos y al género *Ganoderma* P. Karst. En Colombia se tiene registro de este en la región Amazónica y en el departamento de Antioquia (Urabá), donde fue colectado por el grupo de Micología de la Universidad de Antioquia. Este hongo se desarrolla sobre madera muerta como robles, caobas, nogales y caucho (Zapata 2010).

G. lucidum, también conocido como Lingzhi y Reishi en la medicina oriental (China y Japón), ha sido ampliamente utilizado pues ostenta una amplia gama de propiedades anticancerígenas y antitumorales o homeostáticos (Bishop et al. 2015; Ahmad 2018). También se han registrado varias marcas comerciales nutricéuticas, en formas de bebidas saludables, polvos, tabletas, cápsulas y suplementos dietarios que aún no han sido aprobadas clínicamente (Moore et al. 2011). Debido a esto, los científicos han tratado de entender y caracterizar cuáles son los mecanismos y los componentes farmacológicos que ostenta *G. lucidum* y a los cuales se les atribuye su actividad biológica. En las investigaciones realizadas, se ha reportado que los principales componentes bioactivos de este hongo son polisacáridos tipo β -D-glucano, lactonas, nucleótidos, triterpenoides tipo lanostanos (ácidos ganodéricos), esteroides, ácidos grasos, alcaloides, proteínas y péptidos (Russell & Paterson 2006; Cui et al. 2015).

Por otra parte, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, es un hongo basidiomicete, comestible y ampliamente cultivado que hace parte del orden *Agaricales*, son importantes en los ecosistemas naturales, ya que son saprótrofos y crecen en materia orgánica en descomposición (principalmente madera). *P. ostreatus*, pertenece a la familia Pleurotaceae que posee una amplia distribución y alberga alrededor de 54 especies. El género *Pleurotus*, comúnmente llamados hongos ostras, ostenta un basidiocarpo que puede encontrarse solitario o cespitoso, con himenóforo lamelado, con sistema hifal monomítico, hifas hialinas, septadas y con fíbulas (Cepero de García et al. 2012).

P. ostreatus crece en una amplia gama de sustratos, tales como desechos agrícolas como el aserrín, mazorcas de maíz, residuos de café molido, tallos y hojas de banano, vainas de frijoles, pulpa de cardamomo, cáscaras de coco, entre muchos más (Baars 2018). En la actualidad a este hongo se le han atribuido varias propiedades a la salud (Nehra et al. 2012), pues sintetiza una amplia gama de vitaminas, aminoácidos, minerales y antioxidantes (Uddin Pk et al. 2019). Nehra y colaboradores (2012) también afirman que se ha utilizado tradicionalmente para fortalecer las venas y relajar los tendones y en China se recomienda para relajación articular y muscular; también se ha demostrado que los extractos etanólicos de cepas de *Pleurotus* spp. tienen un fuerte efecto inhibitor del estrés oxidativo a nivel del hígado y el cerebro, por otra parte, investigaciones *in-vivo*, revelan que el consumo de hongos ostra disminuye los niveles de colesterol y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, pues estos contienen hasta 2.8% de lovastatina en peso seco, fármaco que es comúnmente utilizado para regular los niveles de colesterol en la sangre (citado por Nehra y colaboradores (2012) de Rop et al. (2009).

Aunque hay varios reportes del uso de *P. ostreatus* para el tratamiento de patologías clínicas (Nehra et al. 2012; Papaspyridi et al. 2012; Mohamed & Farghaly 2014), aún existe mucho desconocimiento del potencial de los metabolitos primarios o secundarios que pueda secretar y excretar este hongo para el control microorganismos fitopatógenos. Hasta la fecha solo se ha reportado por Chu y colaboradores (2005) el aislamiento de la proteína antifúngica *Pleurostrin* del basidiocarpo de *P. ostreatus*, estos investigadores encontraron que este péptido de 7kDa, es capaz de inhibir el desarrollo micelial de hongos fitopatógenos como *F. oxysporum*, *P. arachidicola* y *P. piricola*.

Aunque ya se han aislado diferentes metabolitos del basidiocarpo de *P. ostreatus* (ácidos, alcoholes, alcanos, amidas, ésteres, ácidos grasos, terpenoides, y fenoles heterocíclicos), aún se desconoce cuáles de ellos están implicados en el antagonismo de hongos de importancia médica y para nuestro caso particular de hongos fitopatógenos.

De acuerdo a lo reportado en la literatura y con base a las investigaciones realizadas por el Grupo de Biotecnología de la Universidad de Antioquia en convenio con AUGURA, se están desarrollando alternativas limpias de control de la enfermedad Sigatoka negra, mediante la búsqueda y evaluación de estrategias de control biológico y la producción de metabolitos activos, con el fin de disminuir el uso de agroquímicos, y abastecer la demanda creciente de controladores asociada al incremento de la agricultura orgánica en el país y en el mundo. En este sentido, se ha venido realizando evaluaciones para determinar la interacción entre hongos fitopatógenos y hongos biocontroladores, encontrando que los medios extracelulares e intracelulares, las fracciones tipo triterpenoides del hongo *G. lucidum*, presentan actividad inhibitoria sobre el crecimiento y la germinación de ascosporas de *P. fijiensis*. Diferentes experimentos sugieren que estas matrices complejas de *G. lucidum* son una alternativa interesante y con alto potencial para el biocontrol de hongos fitopatógenos.

Particularmente, con esta investigación se quiere evaluar el potencial biofungicida de las setas medicinales *G. lucidum* & *P. ostreatus* y su relación con los diferentes tipos de metabolitos producidos durante la fermentación en estado líquido para inhibir el desarrollo de *P. fijiensis* a nivel *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de cultivos monospóricos de *Pseudocercospora fijiensis*.

Para lograr aislar las ascosporas de *P. fijiensis*, se seleccionaron hojas de banano enfermas con Sigatoka negra, luego se realizaron recortes de estas en cuadrados de 2x2 cm, posteriormente fueron adheridas a círculos de papel kraft, asegurando que el lado abaxial de las hojas quedase orientado hacia el papel; posteriormente el montaje fue puesto en cámara húmeda durante 72 horas en oscuridad; pasado este tiempo, se tomaron los discos y se sumergieron por 10 minutos en agua destilada, y luego de retirar el exceso de agua se procedió a realizar la descarga en agar-agar al 2% dando golpes sobre la tapa, finalmente se dejaron en incubación por 16 horas en total oscuridad. Pasado este tiempo se retiraron los círculos de papel y empelando una jeringa y bajo observación microscópica (microscopio de Fluorescencia Nikon 80i), se seleccionaron áreas donde la aglomeración de ascosporas de *P. fijiensis* fuese baja con el fin de facilitar su caza, las ascosporas fueron inoculadas en agar PDA, a temperatura ambiente y en total oscuridad durante 45 días, además se realizó seguimiento periódicamente.

1.1 Descripción microscópica de las ascosporas.

La selección de las esporas se realizó teniendo en cuenta las características propuestas por Arzanlou y colaboradores (2008); ascosporas hialinas, globosas, con germinación bipolar paralela a la espora, con un septo y una pequeña constricción en el hilio; es importante debido a que algunos de los atributos anteriormente mencionados son muy similares a otras especies de *Pseudocercospora* (*P. musicola* y *P. eumusae*).

1.2 Descripción macroscópica de las colonias.

Para realizar la descripción a nivel macroscópico de las colonias se tuvo en cuenta las siguientes características: tasa de crecimiento, color, forma y su consistencia.

1.3 Siembra a profundidad de *Pseudocercospora fijiensis*.

Para llevar a cabo esta siembra, se procedió a realizar en primer lugar el preinóculo y para ello, se maceró el micelio de un cultivo monospórico de *P. fijiensis* con caldo Sabouraud-Glucosa al 2%; luego el macerado fue filtrado en un holder metálico, seguidamente y dejando reposar por 15 minutos, se realizaron mediciones de la densidad óptica (OD) del macerado en espectrofotómetro a 600nm, para ajustar la OD a 0,125 en caldo Sabouraud-Glucosa 2%. Posteriormente para cada caja con Agar PDA o BIO-VEG se adicionó 1mL del macerado; terminado este proceso las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente y en oscuridad por 10 días.

2. Obtención de las cepas R1 de los hongos comestibles y medicinales *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus ostreatus*.

Las cepas de *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus ostreatus* utilizada para llevar a cabo esta investigación pertenece al cepario del Laboratorio de Biotecnología – Universidad de Antioquia. Entre tanto, para la obtención de las cepas R1 de *G. lucidum* y *P. ostreatus*, se realizó un corte en el estípite, utilizando un bisturí estéril bajo cabina de flujo laminar, luego los trozos fueron cultivados en agar BIO-VEG que tiene la siguiente composición:

Agar BIO-VEG: pH = $5.6 \pm 0,1$

Fuente de carbono:

- Harina cereal → 30 g/L
- Sacarosa → 5 g/L

Fuente de nitrógeno:

- Extracto de levadura → 3 g/L

Agar-Agar → 8 g/L

3. Fermentación en estado líquido (FEL) o cultivo sumergido de *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus ostreatus*.

Para realizar la FEL de *G. lucidum* y *P. ostreatus* se procedió a obtener primero precultivos en estado líquido en matraces de 250mL con 62mL de medio estéril y cuya composición era la siguiente:

Precultivo Sumergido:

Fuente de carbono: Harina → 30g/L

- NaNO_3 → 80 mg/L
- KH_2PO_4 → 30 mg/L

Solución de sales: pH: $5,6 \pm 0,1$

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ → 20 mg/L
- KCl → 10 mg/L

Para inocular cada uno de los precultivos se utilizaron 5 recuadros de $\approx 1\text{cm}^2$ de micelio de cada cepa medicinal, estos fueron incubados a 25°C , en agitación constante a 100rpm en un agitador orbital durante 7 días. Luego estos precultivos fueron utilizados como fuente de inóculo para los cultivos sumergidos a escala de 1000mL.

3.1 Cultivos sumergidos a escala de 1000mL.

Para establecer la FEL en matraces de 1000mL, se tomó 5g de biomasa húmeda para inocular 400mL de medio estéril con igual proporción de nutrientes que para los [precultivos](#).

3.2 Cultivos sumergidos en diferentes fuentes de Carbono (no convencionales).

Este bioensayo se llevó a cabo siguiendo la misma metodología para la obtención de los [precultivos](#) (numeral 3), aquí solo se modificó la fuente de carbono, con el fin de observar si la actividad antifúngica, estaba ligada a una producción diferencial de metabolitos primarios y secundarios que se sintetizan dependiendo del sustrato en el que los hongos medicinales crecían.

Para esta prueba se utilizaron diferentes tipos de harinas cereales como fuente de carbono, bajo la siguiente nomenclatura:

- FC1: Cebada
- FC2: Avena
- FC3: Trigo
- FC4: Arroz
- FC5: Bienestaria
- FC7: Maíz
- FC8: Soya
- FC9: Trigo
- FC10: Trigo Integral
- FC11: Maíz Amarillo
- FC12: Siete Granos
- FC13: Maíz Pinto

4. Ensayos de antagonismo por los métodos de siembra a profundidad y enfrentamiento dual.

4.1 Antagonismo a profundidad de *G. lucidum* & *P. ostreatus* sobre *P. fijiensis*.

Pasados los 8 días de la siembra a profundidad de *P. fijiensis* en cada tipo de agar (PDAL suplementado con hojas de banano o BIO-VEG), se asentó un disco de micelio de ≈ 0.8 cm de diámetro con cada tratamiento (*G. lucidum* & *P. ostreatus*). El periodo de incubación fue de 15 días en promedio, a temperatura ambiente y en total oscuridad. También se tuvo en cuenta el control positivo (control de crecimiento) y se realizó seguimiento fotográfico y montajes al microscopio con Rojo Congo al 1%, con el fin de observar cambios morfológicos en las hifas del hongo fitopatógeno, como consecuencia del co-cultivo con especies medicinales.

4.2 Antagonismo dual de *G. lucidum* & *P. ostreatus* sobre *P. fijiensis*.

Para llevar a cabo este tipo de antagonismo, se tomó un círculo de $\approx 0,8$ cm de diámetro de un cultivo a profundidad de *P. fijiensis* y fue transferido a 2cm de un de los extremos de una caja de Petri con agar PDAL (PDA suplementado con hojas de banano) o BIO-VEG según fuera el caso (Fig. 6), hecho este procedimiento las cajas fueron llevadas a incubación a temperatura ambiente bajo oscuridad por 20 días, durante este tiempo de incubación se realizaron mediciones del diámetro de la colonia de *P. fijiensis*, las medidas corresponden a 3 diámetros: uno horizontal y dos diagonales (tomando el eje x como el que presentará la zona de enfrentamiento). Pasado este tiempo (20 días) se tomó un disco de micelio $\approx 0,8$ cm de diámetro de *G. lucidum* o *P. ostreatus* y fue colocado en el extremo opuesto al patógeno (*P. fijiensis*), finalmente, este bioensayo fue llevado a incubación por otros 20 días bajo las condiciones mencionadas anteriormente, además se siguió tomando el diámetro de crecimiento de las colonias hasta el final del experimento.



Figura 6: Ensayo de antagonismo dual: *P. fijiensis* (colonia izquierda) y *P. ostreatus* (colonia derecha) en agar FC1 y PDAL respectivamente.

Para cada ensayo se calcularon los porcentajes de antagonismo utilizando la [ecuación 1](#), reportada por El-Gremi y colaboradores (2017):

Dónde: **R**, es el porcentaje de antagonismo; **A**, es el diámetro del control y **B**, el diámetro de los tratamientos.

$$R = \frac{A-B}{A} \times 100$$

Ecuación 1

En este experimento también se tuvo en cuenta el control de crecimiento de *P. fijiensis* y el control de crecimiento del antagonista en ambos medios de cultivo (PDA & BIO-VEG). Como paso final se llevó a cabo un seguimiento fotográfico y se realizaron visualizaciones al microscopio.

5. Inmovilización de *Pseudocercospora fijiensis* en esferas de alginato de sodio en cocultivo con *Ganoderma lucidum* & *Pleurotus ostreatus*.

Para realizar la inmovilización se procedió a mezclar cierta cantidad de preinóculo de *P. fijiensis* con una OD 0,1 ([ver arriba](#)) con una solución de NaCl al 0,85%. Seguidamente se procedió a resuspender esta mezcla en una solución de alginato de sodio al 3% (cerciorándose de que quedase bien homogenizada); se tomó cierta cantidad de la mezcla anteriormente mencionada y se agregó en forma de gotas a una solución de CaCl₂ al 3% para formar las esferas, finalmente se inocularon las esferas en los medios líquidos ([ver numeral 3.1](#)), los cuales fueron puestos en agitación constante a 100rpm. Transcurridas 72 horas de inoculadas las esferas con *P. fijiensis*, se procedió a realizar la inoculación de cada hongo medicinal, en el medio con las esferas inmovilizadas, por lo cual se depositó ≈1g de biomasa de cada precultivo medicinal (*G. lucidum* o *P. ostreatus*). Estos co-cultivos se dejaron en agitación constante a 100rpm durante 7 días más.

5.1 Procesamiento medios extracelulares e intracelulares de las cepas trabajadas.

5.1.1 Medios Intracelulares

Recuperada la biomasa congelada y deshidratada de los cultivos sumergidos, se procedió a realizar disrupción mecánica con un UltraTurrax®, realizando 10 ciclos de homogenizado en buffer PBS pH 7.4 12Mm y 10 ciclos de descanso alternados cada minuto, el proceso se mantuvo a 4°C.

5.1.2 Medios Extracelulares

Los medios extracelulares de los cultivos sumergidos se recuperaron en tubos Falcon de 50mL estériles, por centrifugación a 9000rpm por 10 minutos.

6. Ensayos de actividad antifúngica de las matrices metabólicas de ambas cepas medicinales por el método de microdiluciones en microplatos de 96 pozos.

Para evaluar cada tratamiento mediante el ensayo de actividad antifúngica en microplatos, se tuvo en cuenta los siguientes parámetros:

- **Control positivo o control de crecimiento:** 100µL del inóculo de *P. fijiensis* con un OD=0,1 a 600nm (equivalente a una concentración de 2×10^5 fragmentos miceliares/mL) + 100µL de buffer PBS pH 7.4 12Mm.
- **Control negativo o control de esterilidad:** 100µL de caldo Sabouraud dextrosa al 2% + 100 µL de buffer PBS pH 7.4 12mM.
- **Agente antifúngico o matriz a evaluar:** 100µL del agente elegido disuelto en buffer PBS pH 7.4 12mM a una concentración determinada + 100µL del inóculo de *P. fijiensis* con un OD=0,1 a 600 nm.

NOTA: El buffer PBS pH 7.4 12mM, fue utilizado para disolver los extractos proteicos, mientras que para las demás matrices metabólicas se utilizó Agua + Tween 80 al 0,001%.

El ensayo tuvo una duración de 7 días y el crecimiento micelial fue determinado de manera indirecta a una λ de 600nm en un espectrofotómetro para microplatos de 96 pozos, y el resultado de la actividad antifúngica se determinó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición usando la [ecuación 2](#).

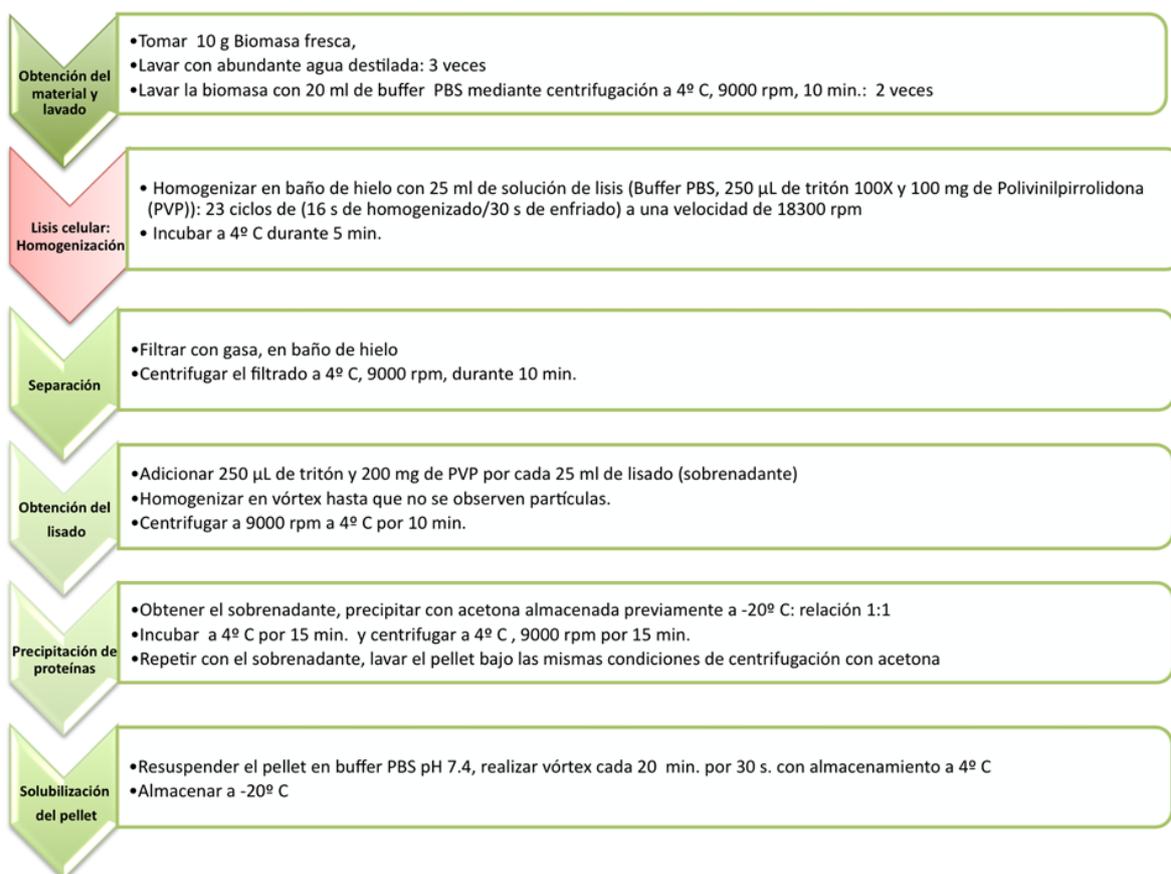
$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia del Control} - \text{Absorbancia del Extracto}}{\text{Absorbancia del Control}} \times 100$$

Ecuación 2

6.1 Preparación del inóculo

Un cultivo monospórico de *P. fijiensis* fue macerado en caldo Sabouraud-Glucosa al 2% y filtrado en un holder metálico, seguidamente y dejando reposar por 15 minutos, se realizaron mediciones de la densidad óptica (OD) del macerado en un espectrofotómetro a 600nm, para ajustar la OD a 0,125 en caldo Sabouraud-Glucosa 2%.

6.2 La extracción de proteínas se realizó con base al siguiente protocolo:



Finalmente los extractos proteicos fueron liofilizados y resuspendidos en buffer PBS pH 7.4 12mM para ser probados en ensayos de actividad antifúngica en microplatos de 96 pozos y en concentraciones desde los 500 hasta 2500ppm.

6.3 Extracción polisacáridos de *G. lucidum* & *P. ostreatus*

6.3.1 Extracción Intrapolisacáridos

Se tomó ≈1g de biomasa seca de cada cepa y se disolvió en 10mL de agua destilada, luego se autoclavó y se dejó 2 horas en ebullición; finalmente se filtró la biomasa de ambos hongos y se tomó el sobrenadante el cual fue esterilizado en autoclave para ser probados en los ensayos de microdiluciones.

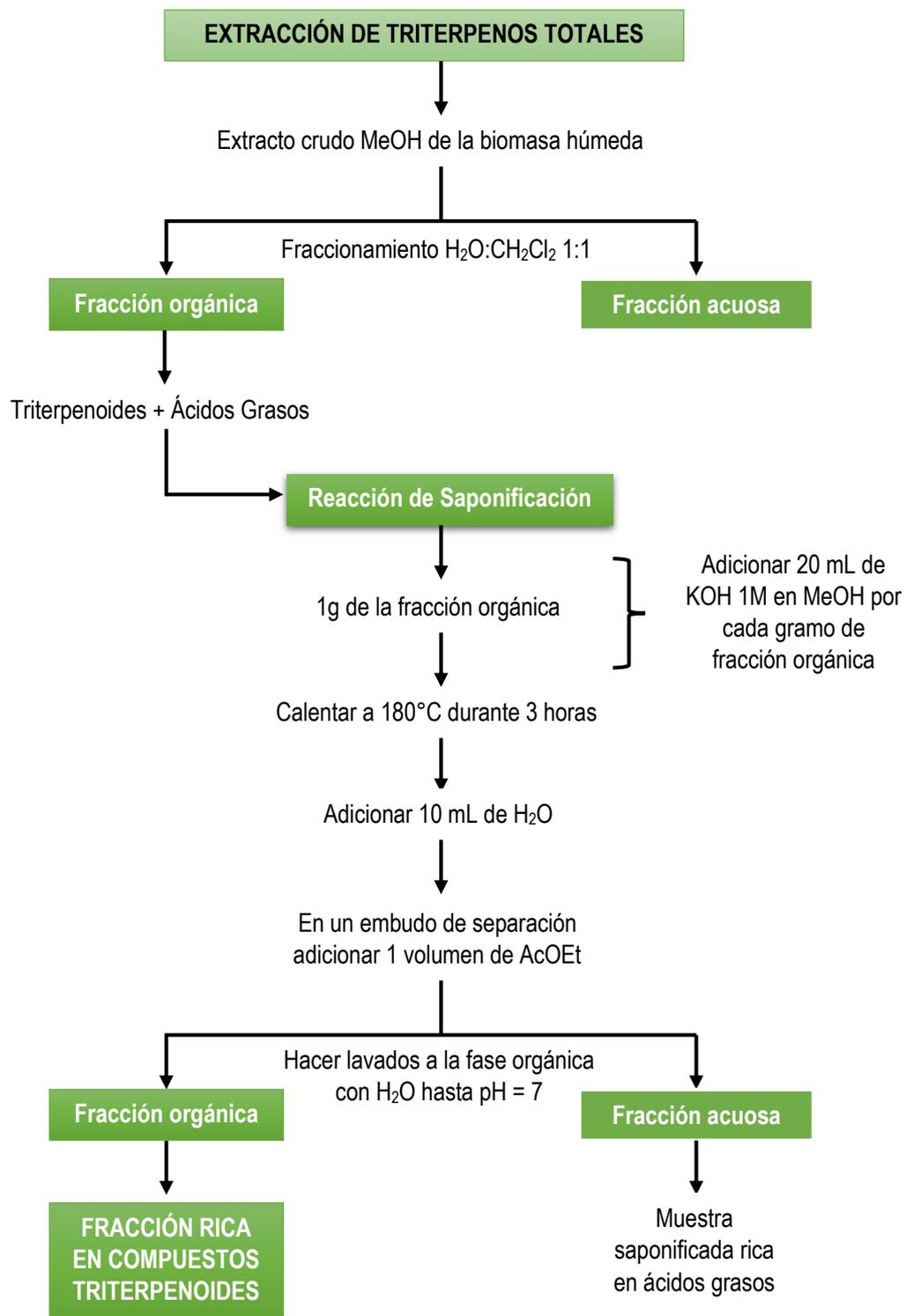
6.3.2 Extracción Exopolisacáridos

Se congeló el medio extracelular de cada cepa a -20°C, luego se descongelaron a temperatura ambiente, con el propósito de recuperar los exopolisacáridos (matriz viscosa). De acuerdo con el volumen obtenido se adicionó 4 veces un volumen de ETOH y se dejó en nevera a 4°C toda la noche, finalmente la solución fue filtrada para recuperar los exopolisacáridos. Teniendo listo los exopolisacáridos de cada cepa, se procedió a pesar 1g húmedo y se colocó en ebullición y

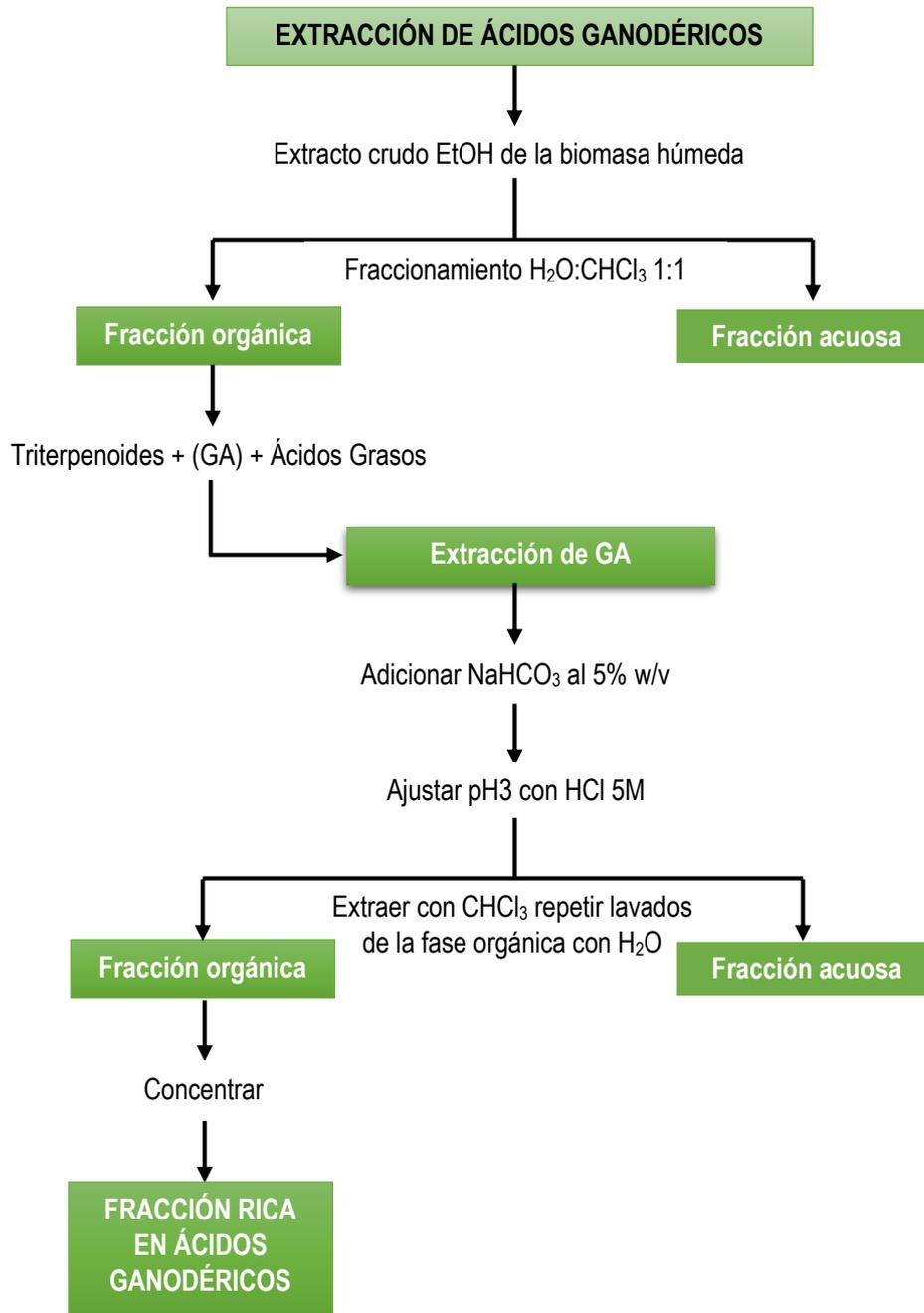
agitación en 20mL de agua por 2 horas, y luego de filtrar la solución, se recuperó el sobrenadante el cual fue también autoclavado para realizar los ensayos de actividad antifúngica.

NOTA: Para cada extracción se realizó la cuantificación de carbohidratos totales por método Fenol – Ácido Sulfúrico (Dubois et al. 1956).

6.4 Extracción de los triterpenos totales de *P. ostreatus* & *G. lucidum* (Nieto & Chegwin 2013; Sepúlveda-Arango 2013).



6.5 Extracción ácidos ganodéricos (Tang and Zhong 2002; Zapata et al. 2012).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Cultivos monospóricos de *Pseudocercospora fijiensis*.

1.1 Descripción microscópica de *P. fijiensis*

Los aislamientos de *P. fijiensis* realizados a partir de hojas de banano en estadio 6 de la enfermedad (según la escala de Fouré), permitieron observar que las ascosporas son de naturaleza hialina, globosas, con un septo y una pequeña constricción en el septo, con germinación tipo bipolar y su tamaño fue $\geq 1\mu\text{m}$, mientras que el tamaño de las ascosporas germinadas llegaron a medir más de $100\mu\text{m}$ (Fig. 7).

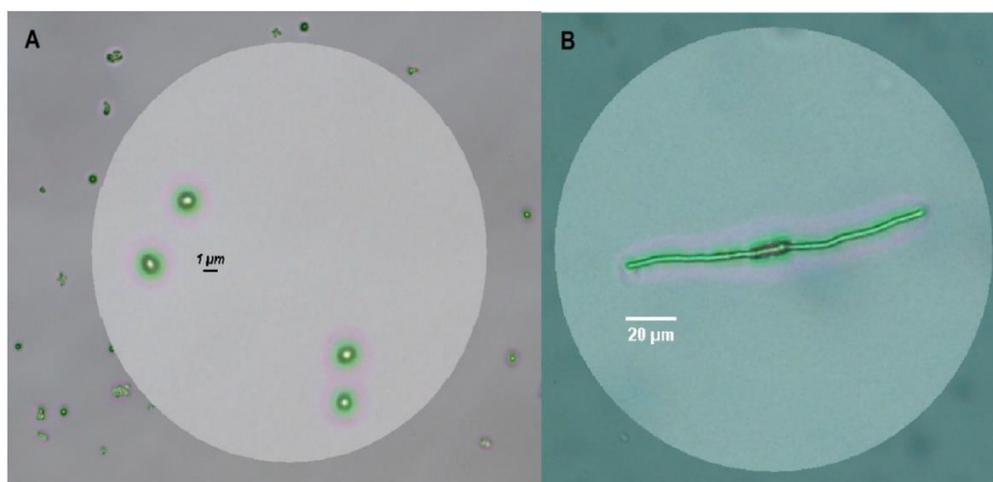


Figura 7: Ascosporas de *P. fijiensis*. A: sin germinar. B: Ascospora germinada a las 24h, fotografías tomadas en un Microscopio Nikon Microscope eclipse 80i. Capturador de imagen Nikon Nis Elements BR 3.2. Grupo de Biotecnología - Universidad de Antioquia.

1.2 Descripción macroscópica de *P. fijiensis*

Las colonias monospóricas de *P. fijiensis* exhiben un crecimiento lento en una primera etapa (14 días), su tasa de crecimiento fue de 1.1 a 6.3mm de diámetro. El color de las colonias va desde gris oscuro a pálido y en sus estados avanzados de crecimiento luce una coloración con tonos que van desde blanco a rosado; su forma de crecimiento aunque es algo inconsistente es casi redonda (bordes irregulares), con márgenes grisáceas y de textura compacta y elevada (Fig. 8A), de forma similar, la siembra a profundidad se torna opaca al inicio del cultivo (Fig. 8B), mientras que al final se transforma en una coloración blanco a rosado de forma homogénea.

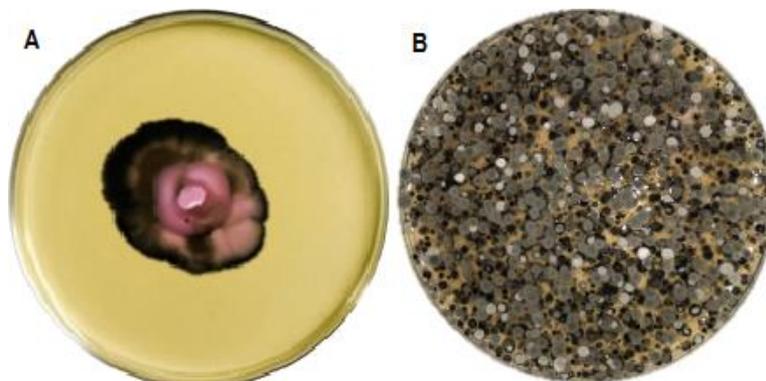


Figura 8: Cultivos de *P. fijiensis*. A: cultivo monospórico. B. Subcultivo en siembra a profundidad luego de 13 días de incubación en Agar PDA.

2. Mantenimiento de cepas medicinales *G. lucidum* & *P. ostreatus* en Agar BIO-VEG.

Ambas cepas fueron mantenidas en agar BIO-VEG e incubadas a 25°C, hasta que se evidenciara un total cubrimiento del hongo medicinal (10 días aproximadamente). Ambos micelios presentaron un crecimiento radial uniforme de color blanco, de textura algodonosa (Fig. 9), aunque *G. lucidum* presentó en estadios avanzados de crecimiento una contextura coriácea.



Figura 9: Cepas R1 en Agar FC1. A: *G. lucidum* con 7 días de incubación. B: *P. ostreatus* con 9 días de incubación

3. Fermentación en estado líquido (FEL) de *G. lucidum* & *P. ostreatus*.

La fermentación en estado líquido permite no sólo la obtención de biomasa fúngica, sino que este tipo de cultivo también permite la obtención de metabolitos primarios (proteínas y polisacáridos) y secundarios (triterpenos y ácidos ganodéricos) que son utilizados con fines medicinales. Con desarrollo de nuestro trabajo se logró establecer un medio de cultivo líquido que permitiera el correcto crecimiento de los hongos medicinales, con el fin de extraer dichos metabolitos, para evaluar su eficacia inhibiendo el agente fitopatógeno *P. fijiensis*. Previamente este medio fue desarrollado en el laboratorio de Biotecnología para el cultivo de setas medicinales, se destaca por ser medio costo-efectivo y competitivo para la obtención de biomasa en fermentación en estado líquido. El costo estimado de la fuente de carbono por litro de medio de cultivo es de COP \$250, lo cual posiona al medio BIO-VEG como un medio económico y propicio para los procesos de escalo de biomasa a nivel de biorreactor (Zapata et al. 2009).|

En el proceso se obtuvo que la producción promedio de biomasa en la fuente de carbono no convencional (FC1), bajo las condiciones citadas anteriormente, fue en promedio de $15,10 \pm 0,1$ g/L para *G. lucidum*, mientras que para *P. ostreatus* se obtuvo una producción promedio de $12 \pm 0,2$ g/L a los siete días de cultivo (ver gráfico 1). Estos resultados son comparables con datos reportados por Hadar & Cohen-Arazi (1986); Fang & Zhong (2002a, 2002b); & Milovanovi et al. (2014), los cuales han reportado un producción de biomasa entre los 16,7 y 17,3 g/L para *G. lucidum*; mientras que para *P. ostreatus* reportan una producción de 11,5 y 11,8 g/L. Sin embargo, estos estudios utilizan fuentes de carbono y de nitrógeno costosas como el extracto de levadura, sacarosa y peptona, por lo cual se encarecen los costos de producción de biomasa micelial.

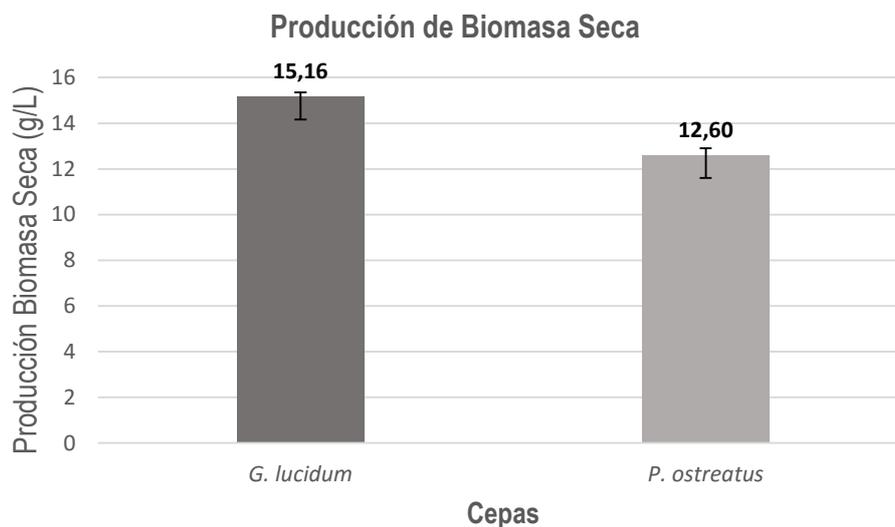


Gráfico 1: Producción de biomasa seca de *G. lucidum* & *P. ostreatus* obtenida de un medio sumergido.

3.2 Cultivos sumergidos en diferentes fuentes de carbono.

Debido al bajo coste de las harinas cereales y su potencial uso como fuente de carbono en los cultivos sumergidos, se evaluó el efecto de otros sustratos cereales sobre la producción de biomasa micelial de *G. lucidum*; encontrándose que las fuentes de carbono que inciden de manera positiva sobre la producción de biomasa de *G. lucidum* son FC10, FC8, FC12 y FC2 (ver Gráfico 2).

Un aspecto importante a considerar es que la producción de metabolitos secundarios como los compuestos tipo triterpenoides, es inversamente proporcional a la cantidad de biomasa producida. Trabajos previos realizados el laboratorio, indican que *P. ostreatus* presenta una mayor producción de compuestos triterpenoides cuando es cultivado en salvado de trigo, pero además, se obtiene una menor producción de biomasa (Sepúlveda-Arango 2013). Durante este trabajo se evaluó el efecto de las diferentes fuentes de carbono sobre la producción de biomasa de *G. lucidum*, obteniéndose una menor producción de biomasa en la fuente de carbono 9, Sin embargo, trabajos posteriores a este, estarán enfocados, en analizar el efecto del sustrato en la producción de compuestos tipo triterpenoide.

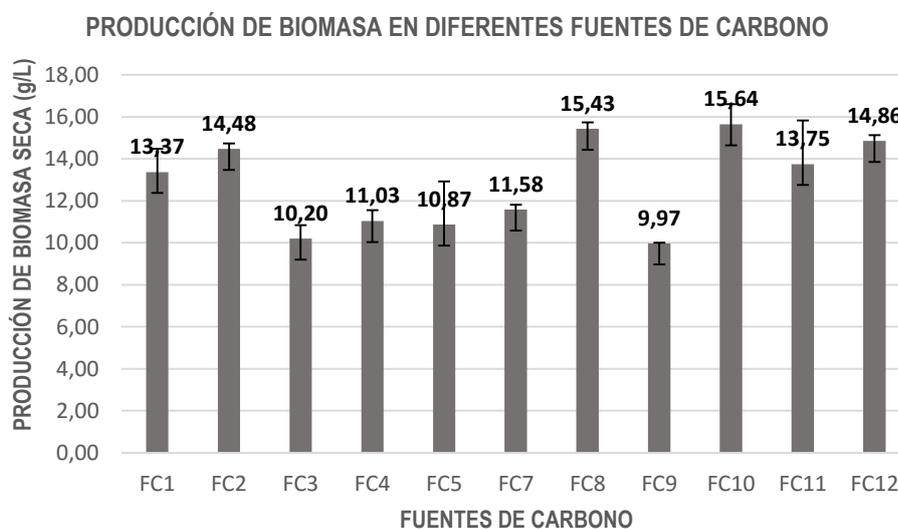


Gráfico 2: Producción de biomasa seca de *G. lucidum* obtenida de diferentes fuentes de carbono.

NOTA: En el apartado 5.1 de los resultados se presenta la actividad antifúngica de los medios intracelulares y extracelulares de *G. lucidum* contra el fitopatógeno *P. fijiensis*.

4. Ensayos de antagonismo por los métodos de siembra a profundidad y enfrentamiento dual.

4.1 Antagonismo en siembra a profundidad.

Los resultados de este ensayo a profundidad están resumidos en la figura 10, donde se evidencia claramente, la capacidad antagónica que exhiben ambas cepas de hongos medicinales sobre *P. fijiensis*. En nuestros ensayos se obtuvo que, en menos de 13 días posterior a la inoculación del respectivo hongo medicinal, estos fueron capaces de sobreponerse al hongo fitopatógeno (*P. fijiensis*), en ambos tipos de agar.

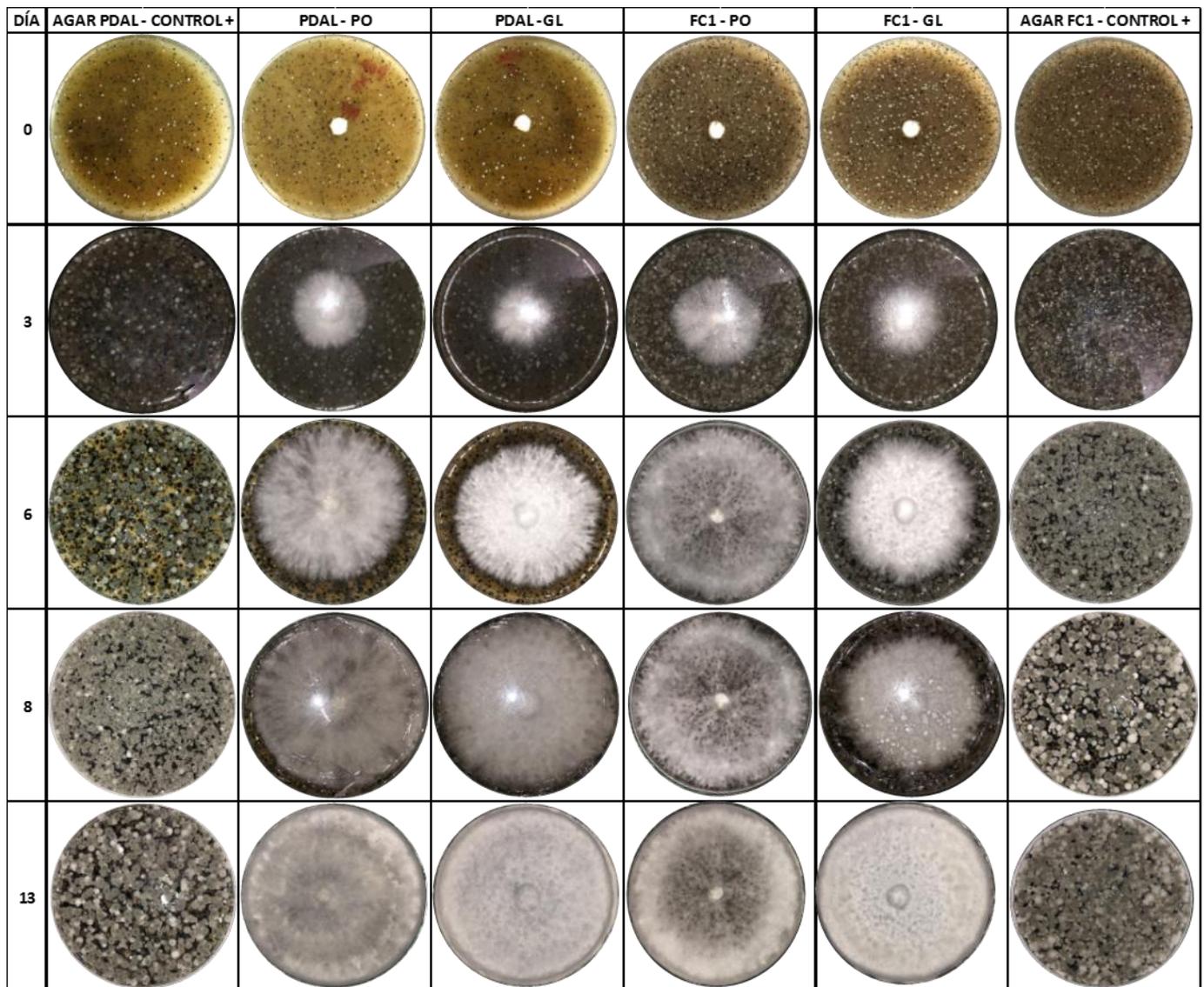


Figura 10: Seguimiento fotográfico en el tiempo de antagonismo por siembra a profundidad de *P. fijiensis* en Agar PDAL & Agar FC1. PO: *P. ostreatus*. GL: *G. lucidum*.

En este ensayo también se tuvo en cuenta las malformaciones que se presentaron en las hifas de *P. fijiensis* como consecuencia del co-cultivo con cada una de las cepas medicinales (*G. lucidum* & *P. ostreatus*), paralelamente se realizó una comparación con el control de crecimiento de *P. fijiensis*, que presenta hifas delgadas, alargadas, con septos visibles y con coloración marrón tenue. Además se evidenció que con cada tratamiento, las hifas de *P. fijiensis* eran más cortas, con malformaciones y ensanchadas en los extremos (Fig. 11C-E).

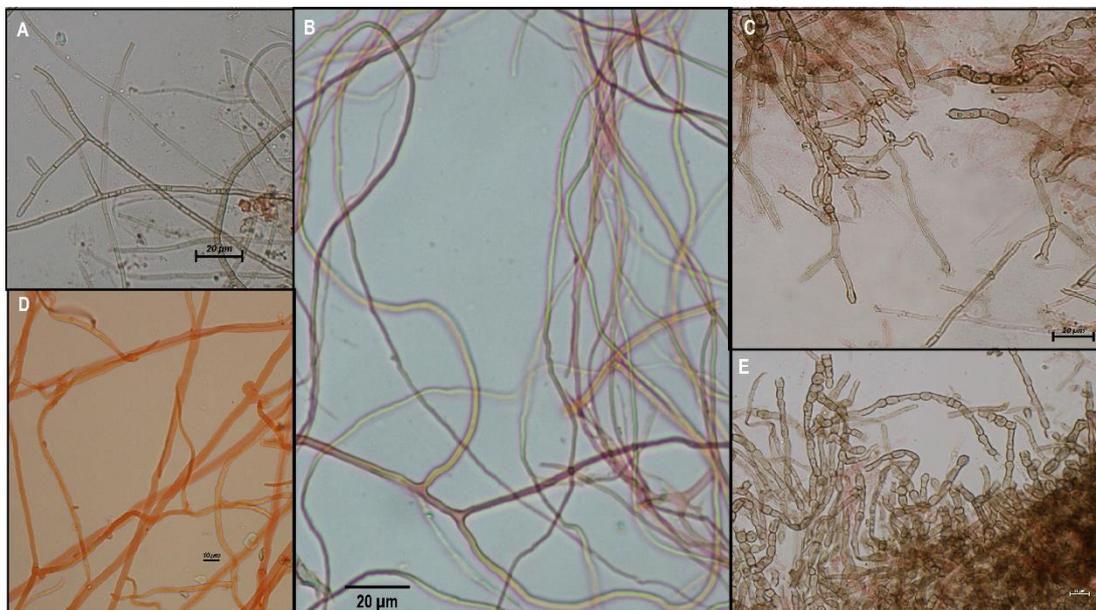


Figura 11: Microfotografías antagonismo a profundidad. A: Hifas control no antagonizadas de *P. fijiensis*. B: Hifas control de *G. lucidum*. C: Hifas control de *P. ostreatus*. C: Hifas de *P. fijiensis* antagonizadas con *G. lucidum*. E: Hifas de *P. fijiensis* antagonizadas con *P. ostreatus*. Los montajes se realizaron en un microscopio Nikon 80i. Tinción con rojo Congo, fotografías realizadas en un microscopio Nikon Microscopio eclipse 80i en objetivo 40X. Capturador de imagen Nikon Nis Elements BR 3.2. Grupo de Biotecnología – UdeA.

4.2 Antagonismo Dual

En los ensayos de enfrentamiento dual, se determinó que el tipo de antagonismo en agar FC1 ejercido por ambas cepas medicinales es de tipo I, según la clasificación de Bell y colaboradores (1982), pues ambos hongos fueron capaces de sobreponerse a *P. fijiensis* (Fig.12). Sin embargo, cuando este mismo experimento es realizado medio PDAL, *G. lucidum* es clasificado como antagonista tipo II, ya que este sólo coloniza dos terceras partes de la superficie del medio. Durante este tipo de enfrentamientos se logró observar el comportamiento de ambas cepas, registrando que inicialmente se da una competencia por espacio, y al final se estaría desencadenando una competencia por los nutrientes presentes en cada tipo medio (PDA o FC1).

Dado que este tipo de antagonismo se llevó a cabo en agar PDAL & FC1, se pudo determinar que la fuente de carbono influye en el crecimiento de los hongos medicinales, ya que en los gráficos 3 - 4 se puede evidenciar un mayor porcentaje de antagonismo cuando el montaje es realizado en agar FC1, esto también es corroborado por las Fig.12 - 13. Este resultado se debe a que la fuente de carbono no convencional (FC1) utilizada en nuestra investigación, favorece el crecimiento de ambos hongos, mientras que el agar PDAL, favorece en menor proporción el crecimiento de hongos basidiomicetes. Este mismo comportamiento es observado en agar PDA incluso cuando no es suplementado con hojas de banano.

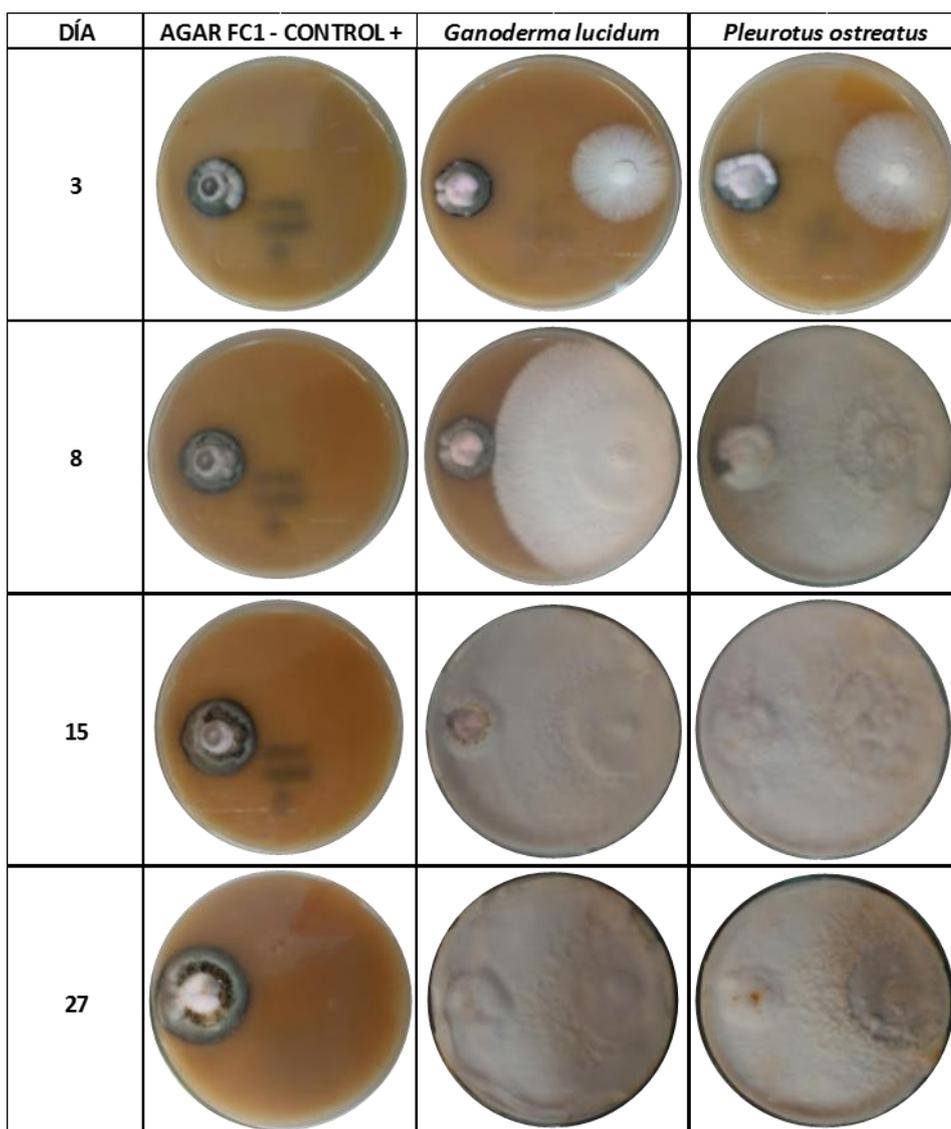


Figura 12: Seguimiento fotográfico en el tiempo de antagonismo dual en Agar FC1. GL: *G. lucidum* – PO: *P. ostreatus*.

Para cada tratamiento se calculó el porcentaje de antagonismo (ver gráfico 4 - 6) utilizando la ecuación 2, nosotros encontramos que la especie *P. ostreatus* en la fuente de carbono convencional PDAL presentó un porcentaje de antagonismo mayor (28,28%) respecto a *G. lucidum* que presentó un 20,28% de antagonismo. Por el contrario, el montaje en agar FC1 revela que *G. lucidum* demuestra más capacidad antagónica alcanzando un porcentaje de antagonismo de hasta un 32,34%, mientras que en este mismo ensayo *P. ostreatus* demostró una menor capacidad antagónica (29,35%). Estos porcentajes de antagonismo en agar FC1, están relacionados con una mayor tasa de crecimiento de los hongos basidiomicetes cuando se utiliza este medio de cultivo, como se indicó anteriormente.

Adicionalmente, se realizaron visualizaciones al microscopio con el colorante rojo Congo al1%, con fin de observar cómo se afecta la morfología de *P. fijiensis* a este nivel; reconociendo que la red micelial de este fitopatógeno se ve perjudicada cuando entra en contacto con cada una de las cepas medicinales. En el enfrentamiento con *G. lucidum* se observó que las hifas de *P. fijiensis* cambió su morfología mostrándose hifas cortas y abultadas (Fig. 14D); mientras que el enfrentamiento de *P. fijiensis* con *P. ostreatus*, las hifas se mostraron abultadas en la zona del septo e irregulares respecto

al control el cual presentó hifas lisas y dematiáceas, con septos notorios de tamaño regular (ver Fig.14B).

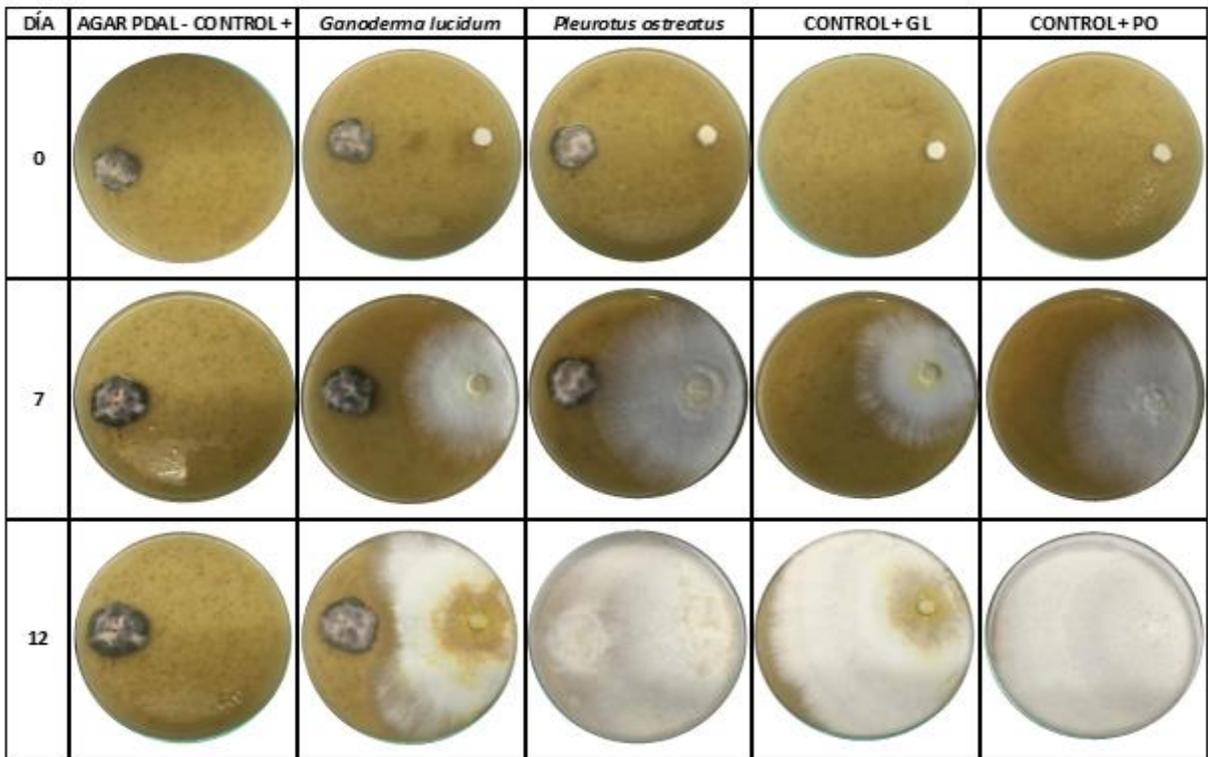


Figura 13: Seguimiento fotográfico en el tiempo de antagonismo dual en Agar PDAL. GL: *G. lucidum* & PO: *P. ostreatus*.

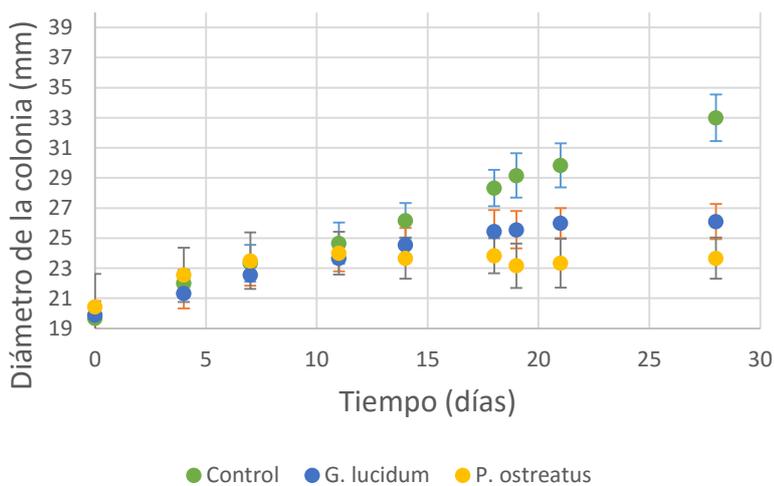


Gráfico 3: Crecimiento de *P. fijiensis* en el tiempo Vs. *G. lucidum* & *P. ostreatus* en cultivos duales. Agar PDAL.

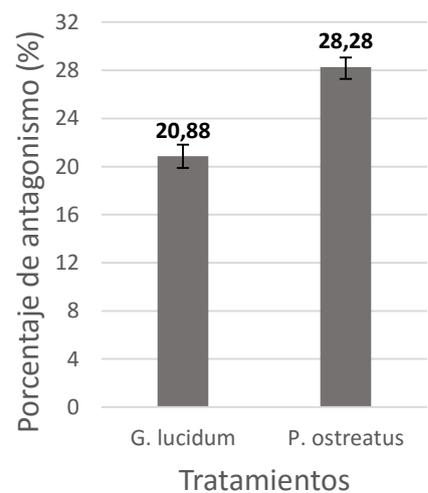


Gráfico 4: Porcentaje de antagonismo ejercido por *G. lucidum* & *P. ostreatus* en enfrentamiento dual. Agar PDAL.

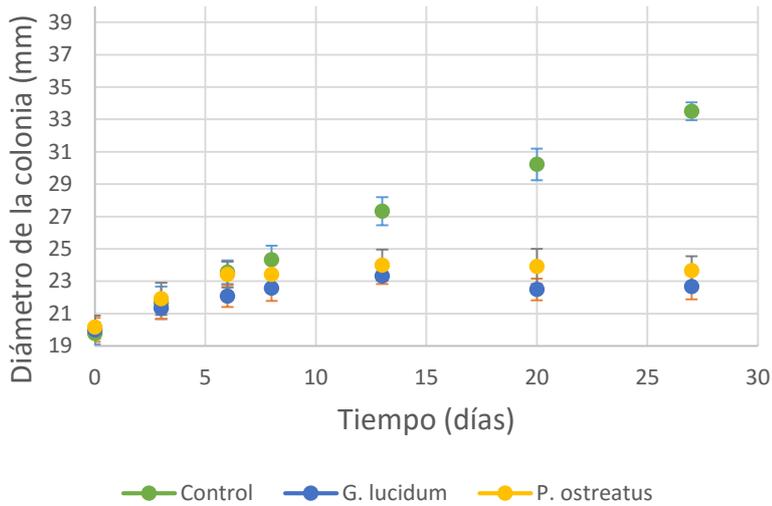


Gráfico 5: Crecimiento de *P. fijiensis* en el tiempo Vs. *G. lucidum* & *P. ostreatus* en cultivos duales. Agar FC1.

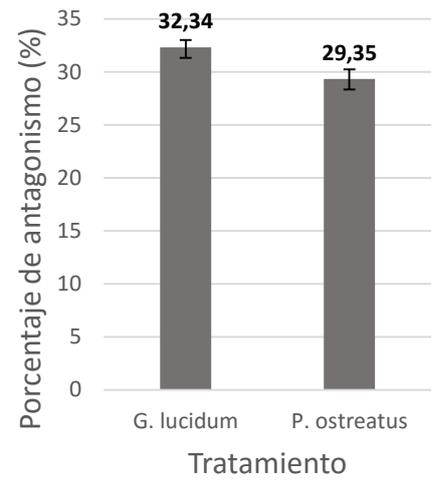


Gráfico 6: Porcentaje de antagonismo ejercido por *G. lucidum* & *P. ostreatus* en enfrentamiento dual. Agar FC1.

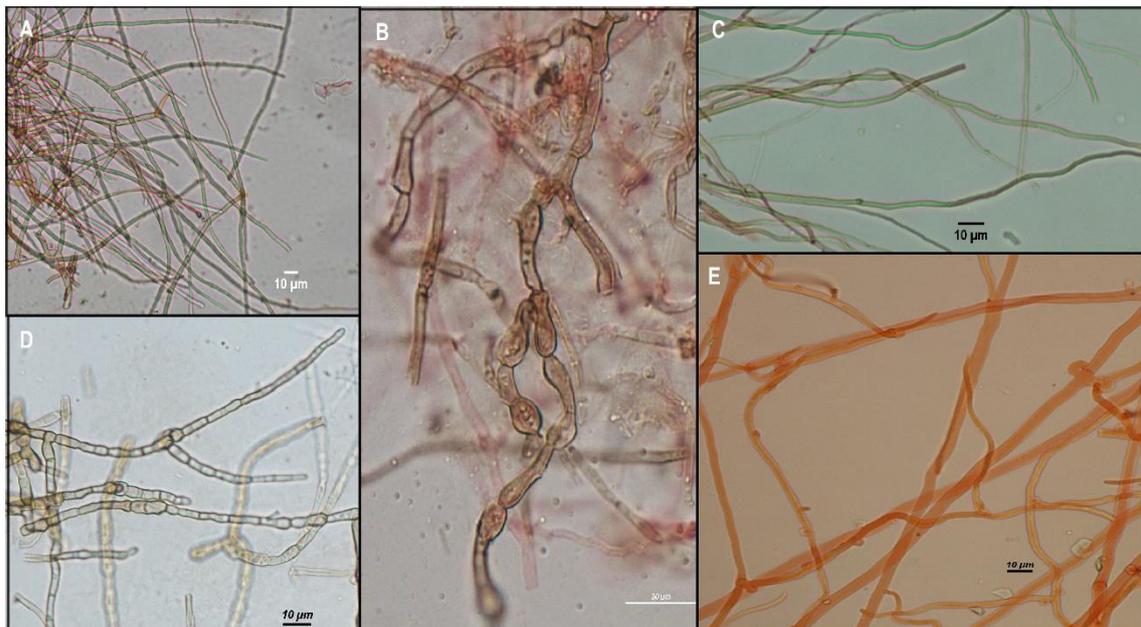


Figura 14: Microfotografías antagonismo dual. A: Hifas control de *P. fijiensis*. B: Hifas de *P. fijiensis* antagonizadas con *P. ostreatus*. C: Hifas control de *G. lucidum*. D: Hifas de *P. fijiensis* antagonizadas con *G. lucidum*. Tinción con rojo Congo, fotografías realizadas en un microscopio Nikon Microscope eclipse 80i en objetivo 40X – B: 40X-2X. Capturador de imagen Nikon Nis Elements BR 3.2. Grupo de Biotecnología – Universidad de Antioquia.

5. Evaluación de la actividad antifúngica de co-cultivos en medio sumergido de las setas medicinales vs *P. fijiensis* inmovilizado en perlas de alginato de sodio.

Con el fin de determinar la capacidad antagonista en medio sumergido, se realizó la inmovilización de *P. fijiensis* en perlas de alginato de sodio y se co-cultivaron en medio líquido con cada cepa medicinal. A partir de los resultados obtenidos se pudo determinar que en el medio control (*P. fijiensis* inmovilizado), fue capaz de colonizar el medio de cultivo por fuera de las esferas (ver Fig. 15A). En el co-cultivo con *P. ostreatus*, *P. fijiensis* sólo fue capaz de crecer dentro de la esfera, mas no de colonizar el medio fuera de la esfera (Fig. 15E). El resultado más interesante de este ensayo se obtuvo con el co-cultivo de *G. lucidum*, en el cual se observó que aparte de impedir la proliferación de *P. fijiensis* fuera de la esfera, fue capaz de inhibir el crecimiento de éste dentro de la esfera (Fig. 15 C – D).

Realizado el trabajo anterior se procedió a recuperar la biomasa y los medios extracelulares de cada cepa medicinal del co-cultivo, con el fin de determinar su actividad antifúngica contra *P. fijiensis*, por medio de ensayos en microplatos como se especifica en el ítem 6 de la metodología. Este ensayo fue definitivo para demostrar que *G. lucidum* es la mejor cepa medicinal para antagonizar el desarrollo de *P. fijiensis* (ver tabla 1), por lo tanto el estudio de los metabolitos y su actividad antifúngica estarán enfocados en esta cepa.

Cepa	Réplica A	Réplica B	\bar{X}	σ	% Inhibición	% CR
<i>G. lucidum</i> Intra	0,058	0,068	0,063	0,007	86	14
<i>P. ostreatus</i> Intra	0,181	0,205	0,193	0,017	57	43
<i>G. lucidum</i> Extra	0,167	0,174	0,17	0,005	62	38
<i>P. ostreatus</i> Extra	0,376	0,364	0,37	0,008	18	82
Control	0,44	0,46	0,45	0,014	0	100

Tabla 1: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. fijiensis* expuesto a los medios intracelulares y extracelulares de *G. lucidum* & *P. ostreatus* recuperados de los co-cultivos inmovilizados con alginato de sodio.

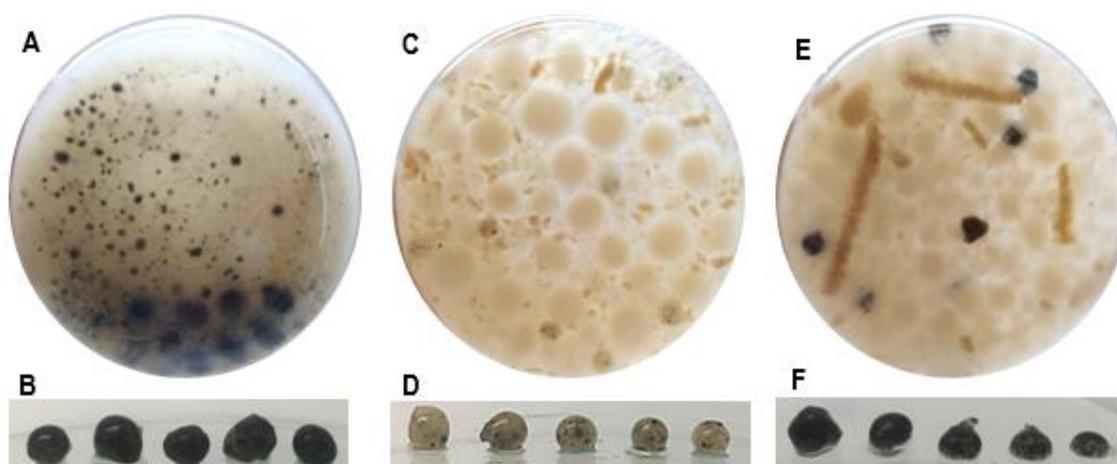


Figura 15: Efecto de las cepas medicinales sobre el crecimiento de *P. fijiensis* inmovilizados en esferas de alginato de sodio, en medio sumergido FC1. A: Control de crecimiento de *P. fijiensis* inmovilizado en esferas de alginato. C: *P. fijiensis* inmovilizado en perlas de alginato en co-cultivo con *G. lucidum*. E: *P. fijiensis* inmovilizado en perlas de alginato en co-cultivo con *P. ostreatus*. B, D & F: Recuperación de las esferas inoculadas con *P. fijiensis* de su respectivo co-cultivo.

Debido a que los medios extracelulares e intracelulares de ambas cepas medicinales presentaron actividad antifúngica (como se reporta en la [tabla 1](#)), se decidió hacer un estudio de las matrices metabólicas, específicamente de los metabolitos primarios (proteínas y polisacáridos), a los cuales se les ha asociado su actividad biológica / farmacológica ([apartado 6](#)).

5.1 Actividad antifúngica de los medios intracelulares y extracelulares de *G. lucidum*.

En los [gráficos 7 & 8](#) se muestran los porcentajes de inhibición que exhibieron los medios intracelulares y extracelulares de *G. lucidum*, cultivados en diferentes fuentes cereales, los cuales fueron realizados en microplatos de 96 pozos.

5.1.1 Actividad antifúngica de los medios intracelulares

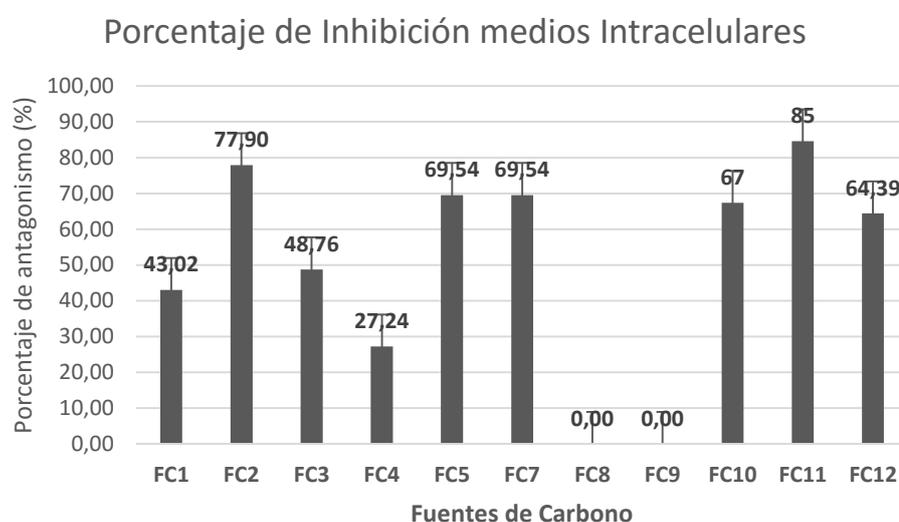


Gráfico 5: Porcentaje de inhibición de los medios intracelulares de *G. lucidum* cultivado en diferentes fuentes cereales.

5.1.2 Actividad antifúngica de los medios extracelulares

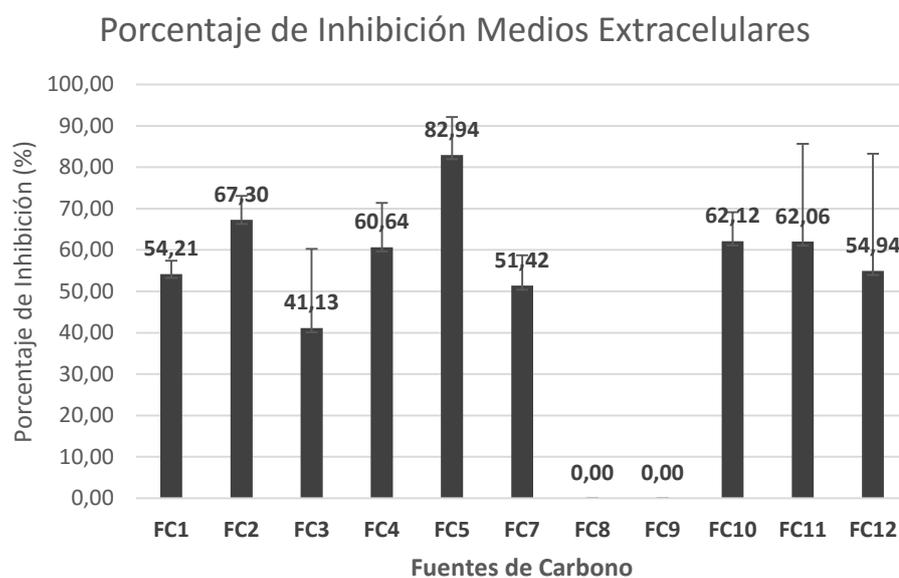


Gráfico 6: Porcentaje de inhibición de los medios extracelulares de *G. lucidum* cultivado en diferentes fuentes cereales.

6. Evaluación de la actividad antifúngica de los metabolitos primarios: Extractos proteicos, Exopolisacáridos e Intrapolisacáridos de *G. lucidum* & *P. ostreatus*.

La actividad antifúngica de los extractos proteicos y de las fracciones polisacáridas de ambas cepas medicinales y comestibles, se realizaron mediante la técnica de microdiluciones en microplatos de 96 pozos.

6.2 Actividad antifúngica de los extractos proteicos

Los ensayos de los extractos proteicos se evaluaron en concentraciones de 500 hasta 2500ppm, sin embargo estos no presentaron actividad antifúngica. No obstante, es de aclarar que los extractos proteicos previamente fueron liofilizados y este proceso tienden a aglomerar y a desnaturalizar las proteínas (Crowe et al. 1998); por lo cual consideramos que resultados de inactividad puedan estar asociados al proceso de secado y a la desnaturalización de las proteínas.

Estudios previos han reportado que el péptido Pleurostrin obtenido de *P. ostreatus* tiene actividad inhibitoria sobre *F. oxysporum*, *P. arachidicola* y *P. pyricola* (Chu et al. 2005). Y aunque *G. lucidum* es muy utilizado para beneficio del hombre, otras investigaciones han reconocido que sus proteínas y péptidos, tienen propiedades antifúngicas, como el caso de Ganodermin que fue aislada del cuerpo fructífero de *G. lucidum*, la cual inhibe el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos como *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *P. pyricola* (Wang & Ng 2006).

6.3 Actividad antifúngica de los Intrapolisacáridos y exopolisacáridos

Para evaluar la actividad antifúngica de los Intrapolisacáridos y exopolisacáridos de ambas cepas medicinales, se procedió a diluir cada fracción obtenida en agua + Tween 80 al 0,001%, en este ensayo se probaron las concentraciones citadas en la [tabla 2](#), sin embargo, estos no presentaron actividad antifúngica contra *P. fijiensis*.

CEPA \ FRACIÓN [ppm]	INTRAPOLISACÁRIDOS		EXOPOLISACÁRIDOS	
	[MIN]	[MAX]	[MIN]	[MAX]
<i>G. lucidum</i>	2400	24000	34	340
<i>P. ostreatus</i>	1280	12800	490	4960

Tabla 2: Concentraciones de los intrapolisacáridos y exopolisacáridos ensayadas para la evaluación de la actividad antifúngica en microplatos de 96 pozos de ambas cepas medicinales.

Si bien los resultados obtenidos sobre la actividad antifúngica de las matrices metabólicas compuestas por extractos proteicos/peptídicos, intra y extrapolisacáridos no presentaron actividad antifúngica significativa contra *P. fijiensis in-vitro*. Los extractos orgánicos de *P. ostreatus* & *G. lucidum* presentaron actividad antifúngica a diferentes concentraciones, en el ensayo de microdiluciones implementado de acuerdo a la metodología propuesta en el [apartado 6](#).

6.4 Actividad antifúngica de los extractos orgánicos tipo triterpenoides de *P. ostreatus*

En cuanto a los extractos orgánicos de *P. ostreatus* sólo presentó actividad antifúngica la fracción orgánica en diclorometano proveniente del extracto metanólico crudo fraccionado con una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 compuesta principalmente por lípidos no saponificables (triterpenoides) + lípidos saponificables (ácidos grasos), la cual presentó una actividad antifúngica a 9000ppm (ver Fig. 16); Sin embargo la fracción no saponificable rica en compuestos triterpenoides no presentó actividad antifúngica significativa a las diferentes concentraciones probadas (100 a 10000ppm). Los resultados anteriores pueden sugerir una actividad antifúngica asociada a los ácidos grasos y a sus ésteres que hacen parte de la fracción saponificable. Otro aspecto a considerar es que las fases acuosas de ambas cepas trabajadas, no presentaron actividad antifúngica contra *P. fijiensis*.

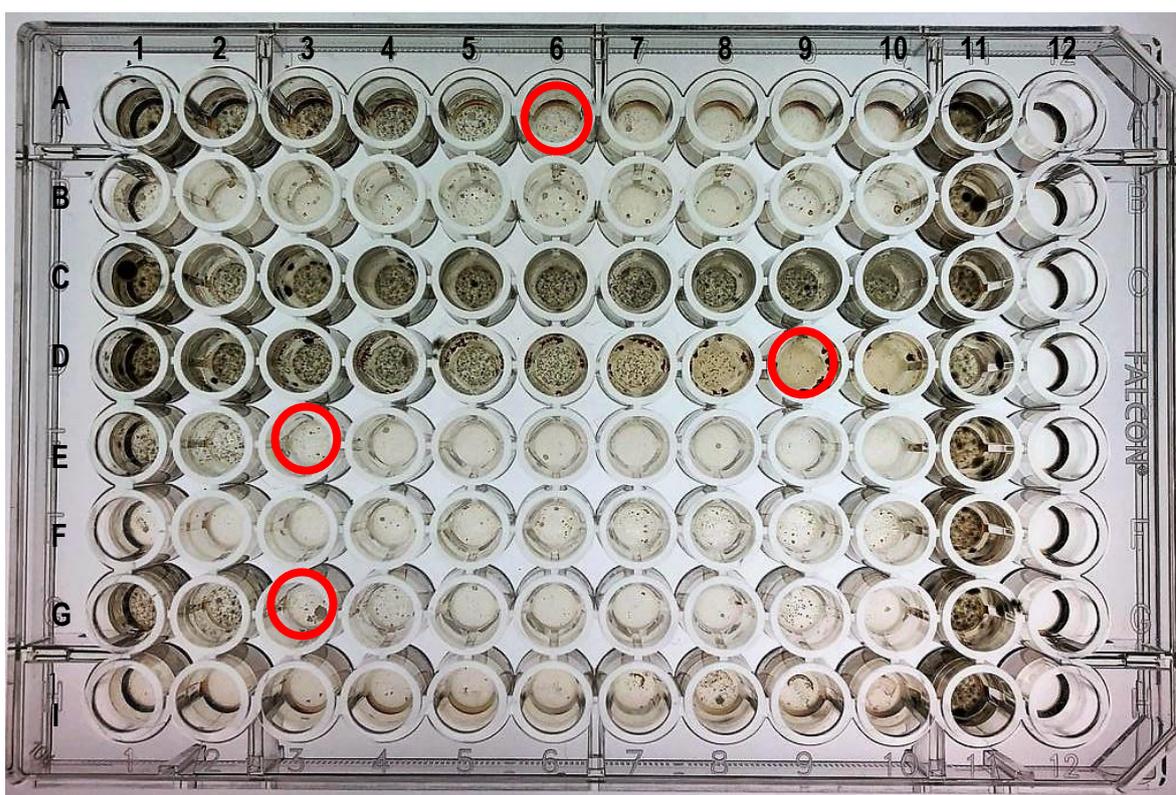


Figura 16: Ensayo de actividad antifúngica de las matrices metabólicas de *G. lucidum* & *P. ostreatus* en microplatos de 96 pozos. Fila A – B: Fracción orgánica de *G. lucidum*. Fila C – D: Fracción orgánica de *P. ostreatus*. Fila E – F & G – H: Fracción rica en ácidos ganodéricos. Columna 11: Control de crecimiento. Columna 12: Control de esterilidad. NOTA: Cada fracción se ensayó en concentraciones que van desde 10 hasta 10000ppm con un intervalo por pozo de 10ppm. Los círculos en rojo denotan las concentraciones a las que fueron activas las fracciones contra *P. fijiensis*.

En estudios previos realizados en el laboratorio de Biotecnología de la UdeA, se identificaron 6 compuestos tipo triterpenoide con núcleos derivados del estigmasterol y el ergosterol (Estigmast-5-en-3-ol, Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, Ergosta-5,7,9, 22-tetraen-3-ol, Ergosta-2,5,7,9, 22-pentaeno Estigmastanol y 5- α -estigmast-3-ona), con actividad antifúngica hacia *C. albicans*, estos compuestos fueron aislados a partir de fracciones orgánicas de cultivos sumergidos de *P. ostreatus*, el cual fue cultivado en diferentes fuente de carbonos (harinas cereales). Adicionalmente, se identificaron los siguientes ácidos grasos Hexadecanoato de etilo, Cis-9-Octadecenoato de etilo, Cis-9,12-Octadecenoato de etilo, Octadecanoato de etilo, Tetradecanoato de etilo, Cis-9-Octadecenoato de metilo, Ácido Hexadecanoico y Ácido Cis-9-Octadecenoico, los cuales fueron asociados con la actividad antifúngica (Sepúlveda-Arango 2013).

6.5 Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de *G. lucidum*

La mayor actividad antifúngica para *G. lucidum* fue exhibida por los extractos orgánicos correspondiente a la fracción enriquecida con ácidos ganodéricos a una concentración de 300ppm, seguido por la fracción orgánica en diclorometano proveniente del extracto metanólico crudo fraccionado con una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 compuesta principalmente por lípidos no saponificables (triterpenoides) + lípidos saponificables (ácidos grasos), la cual presentó una actividad antifúngica a 600ppm. Es importante aclarar que a futuro, está pendiente evaluar la actividad antifúngica de la fracción no saponificable de *G. lucidum* (enriquecida con compuestos tipos triterpenoide). Es importante tener en cuenta que, los ácidos grasos y sus ésteres hacen parte de los metabolitos primarios producidos por las setas, por lo cual se encuentran en mayor proporción y su porcentaje de abundancia en los extractos generalmente oscila entre un 40 y 80%. En cuanto a los metabolitos secundarios tipo triterpenoides, se ha establecido un menor porcentaje de abundancia en los extractos, el cual oscila entre el 2 y 11% dependiendo de las condiciones de cultivo del hongo; además se observa que la fuente de carbono seleccionada como sustrato del hongo, ejerce un rol fundamental en la obtención de este tipo de compuestos (Nieto & Chegwin A 2013).

En *G. lucidum* los constituyentes farmacológicamente activos más importantes siguen siendo los compuestos tipo triterpenoide y los polisacáridos. Durante las últimas décadas, más de 150 compuestos triterpenoidales han sido aislados del género *Ganoderma* (Boh et al. 2007; Zhou et al. 2007) dentro de ellos se encuentran los ácidos ganodéricos derivados del lanosterol a los cuales se les atribuye importantes actividades biológicas como la citotoxicidad para las células del hepatoma, inhibición de la liberación de histamina, inhibición de la síntesis y absorción de colesterol, estimulación de la agregación plaquetaria, así como la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por trombina (Fang & Zhong 2002b).

Las especies pertenecientes al género *Ganoderma* han sido principalmente investigadas por sus propiedades anticancerígenas, antitumorales, antivirales y/u homeostáticas; por este motivo se conocen pocos estudios sobre su actividad antimicrobiana (Russell & Paterson 2006). Sin embargo, algunos compuestos relacionados con la actividad antimicrobiana de *Ganoderma* spp. incluyen ácidos aplanoxídicos, los cuales son compuestos triterpenoides exclusivos de las especies de *Ganoderma* (Smania Jr et al. 2006).

Otros compuestos triterpenoides como los esteroides de *Ganoderma* spp. han presentado actividad antimicrobiana; los esteroides 5α -ergosta-7-en-3- β -ol, 5α -ergosta-7,22-dien-3- β -ol, y 5,8-epidioxi- $5\alpha,8\alpha$ -ergosta-6,22-dien-3- β -ol aislados tanto de *G. australe* como de *G. applanatum* presentaron actividad antimicrobiana contra hongos y bacterias (Lindequist et al. 2005; Smania Jr et al. 2006).

Aunque no es posible relacionar de una manera directa la actividad antifúngica obtenida de los extractos de *G. lucidum* y *P. ostrearius* sobre *P. fijiensis*, con un compuesto en particular, las propiedades antimicrobianas de los extractos podrían asociarse principalmente con la presencia de compuestos tipo triterpenoides (Wasser & Weis 1999) y con la presencia de ácidos grasos y sus derivados (Carballeira 2008). El mecanismo de acción por medio del cual estos metabolitos ejercen una actividad antifúngica, aún no se ha esclarecido. Sin embargo, las propiedades antifúngicas de los ácidos grasos y los posibles mecanismos de acción de su citotoxicidad, han sido relacionados con la inhibición de enzimas claves responsables de la biosíntesis de ácidos grasos fúngicos, o por

causar serios problemas de disrupción o desintegración de la membrana plasmática (Carballeira 2008).

Referido a los triterpenoides, no se ha establecido un mecanismo general de acción. Sin embargo, para triterpenoides como el Fitolacósido B (un triterpenoide glicosilado con actividad antifúngica) se estableció que su mecanismo de acción está relacionado con una alteración de la morfología de levaduras y hongos filamentosos, acompañado de un alto depósito de quitina en la pared celular de *S. cerevisiae* y *N. crassa* que conduce a septos anormalmente gruesos y engrosamiento de la pared celular, lo cual llevaría en última instancia a la detención del crecimiento celular (Escalante et al. 2008). Otros estudios sugieren que el mecanismo de acción de los triterpenoides puede estar asociado a cambios en la permeabilidad de la membrana que conducen a la alteración de la membrana lipídica (Haraguchi et al. 1999)

Entre los componentes mayoritarios caracterizados en los extractos de la biomasa de *G. lucidum* cultivado bajo condiciones de cultivo sumergido en el Laboratorio de Biotecnología incluyen principalmente ácidos grasos como el Ácido Palmítico y ésteres de ácidos grasos como el Palmitato de Etilo, Linoleato de Etilo y el Oleato de Etilo. Algunos compuestos tipo triterpenoide identificados en los extractos de *G. lucidum* incluyen derivados del ergosterol y el estigmasterol: (22E)-Ergosta-5,7,9,(11)-22-tetraen-3- β -ol; Ergosta-5-en-3- β -ol; Estigmast-5-en-3- β -ol; 26,26-Dimetil-5,23-Ergostadien-3- β -ol; Estigmast-4-en-3-ona; Estigmast-5,24(28)-dien-3- β -ol; Estigmast-4,24,(28)-dien-3-ona; 5 α -Estigmast-3-ona; (24R, 24S)-22,24-Dimetilcolesterol. Sin embargo, a la fecha ninguno de estos compuestos triterpenoides ha sido asociado previamente con la actividad antifúngica del hongo medicinal *G. lucidum*. Por otra parte, la fracción enriquecida con ácidos ganodéricos no ha sido caracterizada químicamente y debe confirmarse si corresponde a compuestos triterpenoides derivados del lanosterol, asociados con la estructura química de los ácidos ganodéricos. Es importante resaltar que los ácidos ganodéricos son compuestos altamente oxigenados y este tipo de sustitución puede estar asociado con la actividad antifúngica exhibida por los extractos orgánicos enriquecidos con ácidos ganodéricos.

CONCLUSIONES

- Entre las cepas estudiadas la cepa *G. lucidum* exhibió la mayor capacidad antagónica contra *P. fijiensis*, reportándose una actividad antifúngica del medio extracelular, el medio intracelular y la fracción orgánica enriquecida en ácidos ganodéricos, cuando fue cultivado utilizando el sustrato cereal FC1.
- Si bien es difícil asociar la actividad antifúngica con un grupo particular de metabolitos, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la actividad antifúngica que exhibe *G. lucidum* contra *P. fijiensis* podría estar relacionada con los ácidos ganodéricos; siendo dicha fracción la que presentó una mayor actividad antifúngica a 300ppm.
- Aunque la fracción más activa fue la fracción orgánica enriquecida con ácidos ganodéricos a 300ppm, es importante considerar que los medios extracelulares e intracelulares también presentaron actividad antifúngica y es poco probable que los ácidos ganodéricos alcanzaran dicha concentración en el medio. Por lo anterior, se podría hipotetizar que en los medios intracelulares y extracelulares hay otros componentes responsables de la actividad antifúngica como enzimas, proteínas y otro tipo de metabolitos (primarios y secundarios) responsables de dicha actividad.

PERSPETIVAS

- Se propone la caracterización y el fraccionamiento de los extractos ricos en ácidos ganodéricos con el fin de determinar cuál o cuáles son los compuestos responsables de la actividad antifúngica en este extracto.
- Teniendo en cuenta que la biosíntesis de metabolitos (primarios y secundarios) es influenciada por el sustrato utilizado (fuentes cereales), se pudo determinar que la actividad antifúngica de los medios extracelulares e intracelulares de *G. lucidum* fue diferencial cuando se utilizaron diferentes harinas cereales. Los sustratos en los que se evidenció una mayor actividad antifúngica fueron FC2 (harina de avena) y FC5 (Bienestarina). Por lo anterior, se propone realizar estudios futuros incluyendo estos sustratos cereales.

PRODUCTOS

Los resultados de este trabajo fueron presentados en el III Congreso Internacional CATATUMBARÍ, que se realizó del 18 al 20 de Noviembre de 2020.

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres y Hermanos por todo su apoyo incondicional y sacrificio.

A la Universidad de Antioquia por mi formación académica y a cada uno de los docentes que fomentaron en mí la capacidad de asombro.

Muy especialmente a la Dra. Lucía Atehortúa Garcés por permitirme desarrollar la investigación en su laboratorio y formarme como profesional y al Dr. Ricardo Callejas Posada por su motivación e inspiración.

A mi asesora de tesis la Dra. Liuda Johana Sepúlveda Arango, por toda su paciencia y por compartirme su conocimiento y experiencia científica.

A mis compañeros de la línea de Hongos del laboratorio de Biotecnología: Juliana Romo Buchelly & Daniel Emilio Areiza, por toda su paciencia, conocimiento, consejos y disposición para enseñarme.

A Don Luis Fernando Velásquez por todas sus enseñanzas, apoyo y motivación; y a Anngy Amaya por toda su gestión durante mi estancia en el laboratorio de Biotecnología.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios, G. 2005. Introducción a la Fitopatología.

Ahmad, F. 2018. Biomedicine & Pharmacotherapy *Ganoderma lucidum*: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 107:507–519.

Alvindia, D. G. 2012. Inhibitory influence of biocontrol agents, plant oils and an inorganic salt on *Mycosphaerella fijiensis* and *Cordana musae*, the causal pathogen of black sigatoka and leaf spot of banana. *African Journal of Microbiology Research* 6:4179–4184.

Aristizabal, M. I. 2011. Dinámica poblacional de bacterias de la filósfera de banano (*Musa* sp.) por acción de sustratos foliares relacionado al control de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Universidad Nacional de Colombia.

Arzanlou, M., J. Z. Groenewald, R. A. Fullerton, E. C. A. Abeln, J. Carlier, M. Zapater, I. W. Buddenhagen, et al. 2008. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia* 20:19–37.

Arzate-vega, J., A. C. Michel-Aceves, V. M. Domínguez-Márquez, and O. A. Santos-Eméstica. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) in vitro e Invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:98–104.

Baars, J. 2018. Fungi as Food. Pages 147–168 in K. Kavanagh, ed. Fungi.

Belalcázar-Carvajal, S. n.d. El cultivo del plátano en altas densidades de siembra. Page 11 in Programa de Plátano y Banano, Armenia, Quindío, Colombia.

Bell, D. K., H. D. Wells, and C. R. Markham. 1982. In Vitro Antagonism of *Trichoderma* species Against Six Fungal Plant Pathogens. *Ecology and Epidemiology* 72:379–382.

Bishop, K. S., C. H. J. Kao, Y. Xu, M. P. Glucina, R. R. M. Paterson, and L. R. Ferguson. 2015. Phytochemistry From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry* 114:56–65.

Boh, B., M. Berovic, J. Zhang, and L. Zhi-bin. 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review* 13:265–301.

Carballeira, N. M. 2008. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. *Progress in Lipid Research* 47:50–61.

Ceballos, I. C. 2009. Selección de Bacterias Aeróbicas Formadoras de Endospora Aisladas de La Filosfera de Cultivares de Musa en el Urabá Antioqueño, con Potencial Antagónico Contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Universidad Nacional de Colombia.

Ceballos, I., S. Mosquera, M. Angulo, J. J. Mira, L. E. Argel, D. Uribe-velez, M. Romero-Tabarez, et al. 2012. Cultivable Bacteria Populations Associated with Leaves of Banana and Plantain Plants and Their Antagonistic Activity Against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbial Ecology* 64:641–653.

Cepero de García, M. C., S. Restrepo Restrepo, A. E. Franco-Molano, M. Cárdenas Toquica, and N. Vargas Estupiñan. 2012. Biología de Hongos.

Chica, R., M. Herrera, I. Jiménez, S. Lizcano, J. Montoya, L. Patiño, P. Rodríguez, et al. 2004. Impacto y manejo de la sigatoka negra en el cultivo de banano de exportación en Colombia. Pages 53–62 in XVI

Reunión Internacional Acorbat 2004, Oaxaca, México.

Chu, K. T., L. Xia, and T. B. Ng. 2005. Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides* 26:2098–2103.

Churchill, A. C. L. 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: Progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology* 12:307–328.

Corrales, O., S. Knight, and A. Madrigal. 2002. Manejo de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y el nemátodo barrenador (*Radopholus similis* COBB) en banano, usando el activador de resistencia boost 50 SC dentro de un programa de fitoprotección basado en menos uso de agroquímicos. Pages 143–147 in Reunión Internacional Acorbat, Cartagena.

Crowe, J. H., J. F. Carpenter, and L. M. Crowe. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Reviews of Physiology* 60:73–103.

Cui, M., H. Yang, and G. He. 2015. Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* 16:998–1010.

Deighton, F. C. 1976. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria* Petr. *Mycological Papers* 140:168.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28:350–356.

El-gremi, S. M., I. D. Sobhy, and W. A. Youssef. 2017. Biological control of pathogens associated with kernel black point disease of wheat. *Crop Protection* 91:13–19.

Elbehri, A., G. Calberto, C. Staver, A. Hospido, and D. Skully. 2016. Ecuador's banana sector under climate change: An economic and biophysical assessment to promote a sustainable and climate-compatible strategy. *FAO*.

Escalante, A., M. Gattuso, P. Pérez, and S. Zacchino. 2008. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products* 71:1720–1725.

Etebu, E., and W. Young-harry. 2011. Control of black Sigatoka disease: Challenges and prospects. *African Journal of Agricultural Research* 6:508–514.

Fang, Q., and J. Zhong. 2002a. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites — ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal* 10:61–65.

———. 2002b. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry* 37:769–774.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. Overview of world banana production and trade. Pages 3–38 in *The world banana economy*.

———. 2015. Los suelos están en peligro, pero la degradación puede revertirse.

———. 2018. *Banana statistical compendium 2017*.

———. 2020. *Banana Market Review: Preliminary Results 2019*.

Fravel, D. R. 2005. Commercialization and Implementation of Biocontrol. *Annual Review of*

Phytopathology 43:337–359.

Gepp, V., and P. Mondino. 2000. Apuntes sobre fungicidas.

Greathead, D. J., and J. K. Waage. 1983. Opportunities for Biological Control of Agricultural Pests in Developing Countries.

Hadar, Y., and E. Cohen-Arazi. 1986. Chemical Composition of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* Produced by Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 51:1352–1354.

Haraguchi, H., S. Kataoka, S. Okamoto, M. Hanafi, and K. Shibata. 1999. Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. *Phytotherapy Research* 13:151–156.

Lindequist, U., T. H. J. Niedermeyer, and W. Ju. 2005. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *eCAM* 2:285–299.

Marín, D. H., R. A. Romero, M. Guzmán, and T. B. Sutton. 2003. Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. *Plant Disease* 87:208–222.

Martínez, I., R. Villalta, E. Soto, G. Murillo, and M. Guzmán. 2011. Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano. San José, CR.

Mena-espino, X., and Y. Couoh-Uicab. 2015. Efectos de los plaguicidas utilizados para el control de la Sigatoka negra en plantaciones bananeras en México, así como su efecto en el ambiente y la salud pública. *Tecnociencia* 9:115–122.

Millán Cardona, L. de J., and H. J. Ciro Velásquez. 2012. Caracterización mecánica y físico-química del banano tipo exportación (Cavendish Valery). *Corporación Universitaria Lasallista* 163–192.

Milovanovi, I., I. Brčeski, M. Stajić, A. Korać, J. Vukojević, and A. Knežević. 2014. Potential of *Pleurotus ostreatus* Mycelium for Selenium Absorption. *Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal* 2014:1–8.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural. 2018a. Reporte: Área, Producción y Rendimiento Nacional por Cultivo: Banano Exportación. 28/12/2018.

———. 2018b. Cadena de banano indicadores e instrumentos.

Mohamed, E., and F. Farghaly. 2014. Bioactive Compounds of Fresh and Dried *Pleurotus ostreatus* Mushroom. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 3:4–14.

Moore, D., G. D. Robson, and A. P. J. Trinci. 2011. Exploiting fungi for food. Page 706 in *21st Century Guidebook to Fungi*.

Moreno Pérez, P., M. Gamboa Angulo, G. Heredia, B. Canto Canché, C. M. Rodríguez García, I. L. Medina Baizabal, and L. Peraza Echeverría. 2016. Evaluación antimicrobiana de extractos obtenidos de micromicetos tropicales contra topatógenos Antimicrobial evaluation of extracts obtained from tropical micromycetes against phytopathogens. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 85:7–14.

Mosquera, O. M., L. M. Echeverry, and J. Niño Osorio. 2009. Evaluation of the antifungal activity of plant extracts on the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia et Technica* 15:232–236.

Nehra, K., M. Kumar, and A. Yadav. 2012. Evaluation of antimicrobial potential of fruiting body extracts of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *International Journal of Microbial Resource Technology* 1:391–400.

Nieto, I. J., and C. Chegwin A. 2013. The effect of different substrates on triterpenoids and fatty acids in fungi of the genus *Pleurotus*. *Journal of the Chilean Chemical Society* 58:1580–1583.

- Orozco-Santos, M., J. Orozco-Romero, O. Pérez-Zamora, G. Manzo-Sánchez, J. Farías-Larios, and W. da Silva-Moraes. 2008. Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos. *Tropical Plant Pathology* 33:189–196.
- Osorio-Salamanca, G. P. 2006. Evaluación de hongos endofíticos y extractos botánicos para el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE.
- Papaspyridi, L., N. Aligiannis, E. Topakas, P. Christakopoulos, A. Skaltsounis, and N. Fokialakis. 2012. Submerged Fermentation of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* in a Batch Stirred Tank Bioreactor as a Promising Alternative for the Effective Production of Bioactive Metabolites. *Molecules* 17:2714–2724.
- Patiño, L. F., E. Bustamante, and L. M. Salazar. 2007. Efecto de sustratos foliares sobre la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (*Musa × paradisiaca* L.) Y plátano (*Musa acuminata* Colla). *Agricultura Técnica* 67:437–445.
- Pérez-vicente, L. 2013. Manual on fungicides and fungicide resistance monitoring in banana.
- Ploetz, R. C. 2015. Fusarium wilt of banana. *Phytopathology* 105: 1512–1521.
- Ponsone, M. L., M. L. Chiotta, M. Combina, A. Dalcerro, and S. Chulze. 2011. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 151:70–77.
- Rop, O., J. Mlcek, and T. Jurikova. 2009. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews* 67:624–631.
- Russell, R., and M. Paterson. 2006. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67:1985–2001.
- Sepúlveda-Arango, L. J. 2013. Estudio de la actividad antifúngica de los extractos de tres especies de hongos del genero *Pleurotus* y de seis estatinas comerciales contra el hongo patógeno *Candida albicans*. Tesis de Maestría - Universidad de Antioquia.
- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89:515–521.
- Sivigila, I. N. de S. 2017. Intoxicaciones por sustancias químicas colombia 2017.
- Smania Jr, A., E. F. A. Smania, F. Delle Monache, M. G. Pizzolattic, and G. Delle Monache. 2006. Derivatization Does Not Influence Antimicrobial and Antifungal Activities of Applanoxidic Acids and Sterols from *Ganoderma* spp. *Z. Naturforsch* 61:31–34.
- Tang, Y., and J. Zhong. 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 31:20–28.
- Uddin Pk, M., M. Sayful Islam, R. Pervin, S. Dutta, R. I. Talukder, and M. Rahman. 2019. Optimization of extraction of antioxidant polysaccharide from *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm and its cytotoxic activity against murine lymphoid cancer cell line. *Plos One* 14:1–17.
- Varona-Urbe, M., R. A. Castro, M. I. Páez, N. Carvajal, E. Barbosa, L. M. León, and S. M. Díaz. 2012. Impacto en la salud y el medio ambiente por exposición a plaguicidas e implementación de buenas prácticas agrícolas en el cultivo de tomate, Colombia, 2011. *Revista Chilena de Salud Pública* 16:96–106.
- Varona, M. E., S. M. Díaz-criollo, A. R. Lancheros-Bernal, A. M. Murcia-orjuela, G. L. Henao-Londoño,

- and A. J. Idrovo. 2010. Organochlorine pesticide exposure among agricultural workers in Colombian regions with illegal crops: an exploration in a hidden and dangerous world. *International Journal of Environmental Health Research* 20:407–414.
- Wang, H., and T. B. Ng. 2006. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides* 27:27–30.
- Wasser, S. P., and A. L. Weis. 1999. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. *Critical Reviews in Immunology* 19:65–96.
- Zapata, P. 2010. Sigatoka Negra: Una enfermedad que afecta la producción de Banano y Plátano en las zonas tropicales (Capítulo 1). Tesis Maestría - Universidad de Antioquia.
- Zapata, P. A., D. F. Rojas, D. A. Ramírez, C. Fernández, and L. Atehortúa. 2009. Effect of Different Light-Emitting Diodes on Mycelial Biomass Production of Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 11:93–99.
- Zapata, P., D. Rojas, and L. Atehortúa. 2012. Production of Biomass , Polysaccharides, and Ganoderic Acid using Non-conventional Carbon Sources under Submerged Culture of the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom , *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14:197–203.
- Zhou, X., J. Lin, Y. Yin, J. Zhao, X. Sun, and K. Tang. 2007. Ganodermataceae: Natural products and their related pharmacological functions. *American Journal of Chinese Medicine* 35:559–574.

Anexo 1: Grupos químicos y nombres comerciales reportados para el manejo de la Sigatoka negra

Modo de Acción Bioquímico	Sitio de Acción	Grupo Químico	Ingrediente Activo	Comentarios	Código FRAC	Referencia Bibliografía						
Chemicals with multisite activity	Multi-site contact activity	dithio-carbamates and relatives	mancozeb	low risk	M 03	Varona <i>et al.</i> 2012; Ayala <i>et al.</i> 2014; Aguilar-Barragan <i>et al.</i> 2014						
			zineb			Pérez-Vicente 2013						
			propineb			Romero & Sutton, 1998						
			maneb									
		chloronitriles (phthalonitriles)	chlorothalonil		M 05	Ayala <i>et al.</i> 2014						
Cytoskeleton and motor protein	β -tubulin assembly in mitosis - MBC - fungicides (Methyl Benzimidazole Carbamates)	benzimidazoles	carbendazim	High risk	1	Ayala <i>et al.</i> 2014; Aguilar-Barragan <i>et al.</i> 2014						
			fuberidazole			Pérez-Vicente 2013						
			thiabendazole			Romero & Sutton, 1998; Ayala <i>et al.</i> 2014						
			benomyl									
		N-phenyl carbamates	diethofencarb									
thiophanates	thiophanate											
			thiophanate-methyl			Pérez-Vicente 2013						
Sterol biosynthesis in membranes	C14- demethylase in sterol biosynthesis (erg11/cyp51) - (DMI fungicides (DeMethylation Inhibitors))	triazoles	azaconazole	Medium risk	3							
			bitertanol									
			bromuconazole									
			cyproconazole									
			difenoconazole									
			diniconazole									
			epoxiconazole									
			fenbuconazole									
			fluquinconazole									
			flusilazole, flutriafol									
			hexaconazole									
			imibenconazole									
			ipconazole, metconazole									
			myclobutanil									
			penconazole									
			propiconazole									
			prothioconazole									
			tebuconazole									
			tetraconazole									
			triadimefon, triadimenol									
			triticonazole									
		simeconazole										
						imidazoles	imazalil					
							pefurazoate					
							triflumizole					
							Prochloraz					
						piperazines	triforine					
						pyridines	pyrifenox					
						pyrimidines	fenarimol					
							Nuarimol					
			Reductase and isomerase in sterol biosynthesis (erg24, erg2) - Amines			morpholines	dodemorph	Low to medium risk	5			
							Tridemorph					Pérez-Vicente 2013
							fenpropimorph					Ayala <i>et al.</i> 2014; Sánchez <i>et al.</i> 2017
		spiroketal-amines	spiroxamine									
		methoxy-acrylates	picoxystrobin									
			azoxystrobin			Pérez-Vicente 2013						
Respiration	Complex III: cytochrome bc1 (ubiquinol oxidase) at Qo site (cyt b gene) - QoI-fungicides (Quinone outside Inhibitors)	methoxycarbamates	pyraclostrobin	High risk	11	Aguilar-Barragan <i>et al.</i> 2014; Sánchez <i>et al.</i> 2017; Pérez-Vicente 2013						
		oximinoacetamides	metominostrobin									
		oxazolidinediones	famoxadone									
		dihydrodioxazines	fluoxastrobin									
		imidazolinones	fenamidone									
		oximino-acetates	kresoxim-methyl trifloxystrobin									
		dicarboximides	vinclozolin									
		pyridine- carboxamides	boscalid									
		complex II: succinate-dehydrogenase - SDHI (Succinate-dehydrogenase inhibitors)	pyridinyl-ethylbenzamides	fluopyram		7	FRAC 2010					
			pyrazole-4- carboxamides	isopyrazam								
Signal transduction	MAP/Histidine- Kinase in osmotic signal transduction (os-1, Daf1)	phenylpyrroles	fludioxonil	Medium to high risk	2	Aguilar-Barragan <i>et al.</i> 2014						
	MAP/Histidine- Kinase in osmotic signal transduction (os-2, HOG1)	dicarboximides	vinclozolin	Low to medium risk	12							
Amino Acid and Protein Synthesis	methionine biosynthesis (cgs gene proposed) - AP fungicides (Anilino-Pyrimidines)	AP - fungicides (Anilino-Pyrimidines)	cyprodinil	Medium risk	9	Pérez-Vicente 2013						
			mepanipyrim									
			pyrimethanil									
Host defense inducer	salicylic acid pathway host plant defense induction	benzo-thiadiazole BTH	acibenzolar- S-methyl ASM	No data	P1							
Unknown mode of action	cell membrane disruption (proposed) - Guanidines	guanidines	dodine		U 12	FRAC 2010						