



Actividad antifúngica de cuatro especies de plantas del género *Piper* con aplicación a cultivos de plátano en el Suroeste Antioqueño.

Nombre del estudiante

Juan Fernando López Bolívar

ASESOR

Ph.D. Ana María Mesa Vanegas

COASESOR

Ph.D Omar Ocampo Jiménez

Trabajo de grado para obtener el título de: Biólogo

Grupo de Investigación

AgroBiotecnología

Directora

Ph.D Zulma I. Monsalve Fonnegra

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MEDELLÍN- COLOMBIA 2020**

Contenido	
Resumen	4
INTRODUCCIÓN	6
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
2. MARCO CONCEPTUAL O ESTADO DEL ARTE	12
2.1 Enfermedades más comunes en el cultivo de plátano	13
2.1.2 Mal de Panamá (<i>Fusarium oxysporum</i>)	14
2.1.3 Sigatoka Negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>)	16
2.3 Alternativas con bioinsumos ecológicos	17
2.4 Plantas del genero <i>Piper</i>	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Colecta de los hongos fitopatógenos	21
4.1.1 Material vegetal	21
4.1.2 Diseño experimental para la colecta de foliares en cultivo de plátano	21
4.2 Aislamiento, mantenimiento y caracterización fenotípica en laboratorio de los hongos fitopatógenos	22
4.2.1 Cultivo, aislamiento y mantenimiento de <i>Fusarium sp.</i> y <i>Mycosphaerella sp.</i>	22
4.3 Identificación de <i>Fusarium sp.</i> y <i>Mycosphaerella sp.</i>	23
4.3.1 Técnica de microcultivo	23
4.3.2 Variables fenotípicas evaluadas.....	24
4.4 Obtención de extractos a partir de género <i>Piper</i>	24
4.5 Evaluación de la actividad antifúngica.....	25
4.6 Análisis estadístico.....	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1 Colecta de los hongos fitopatógenos	26
5.2 Aislamiento y mantenimiento de los hongos fitopatógenos.....	30
Identificación de <i>Fusarium sp.</i> y <i>Mycosphaerella sp.</i>	32
5.3.1 Técnica de microcultivo	32

5.4	Evaluación de la actividad antifúngica.....	36
6	DISCUSIÓN.....	45
7.	CONCLUSIÓN.....	46
8.	PERSPECTIVAS	47
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	48
10.	ANEXOS	52

Resumen

Las musáceas, son afectadas por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, agente causante de la enfermedad más destructiva de estos cultivos conocida como Sigatoka Negra, y el hongo deuteromiceto *Fusarium oxysporum*, causante de la enfermedad más persistente en suelos denominada como Mal de Panamá. Estos hongos generan pérdidas económicas considerables tanto para los grandes como los pequeños cultivadores. En el control de estas enfermedades, se emplean diversos tipos de fungicidas de origen sintético que aumentan los costos de producción, afectan la salud humana y causan un deterioro significativo al medio ambiente.

Los estudios realizados con extractos de plantas han evidenciado resultados prometedores de su acción reguladora sobre un gran número de plagas y enfermedades. Este efecto se ha atribuido a la presencia de un grupo de metabolitos secundarios presentes en diferentes partes de las plantas que les confieren una protección natural; por ello se estudia la posibilidad que sean utilizados en el manejo de enfermedades que afectan a las plantas cultivadas. Existen pocos reportes y escasos productos comerciales de extractos vegetales usados contra *Mycosphaerella fijiensis* y *Fusarium oxysporum*. Los extractos vegetales son una propuesta promisoría para evitar el uso de productos agroquímicos que causan un control efectivo de los hongos causantes de enfermedades en plantas, pero también de hongos beneficiosos para el cultivo e incluso para el suelo. El control de fitopatógenos a base de extractos naturales tienen gran potencial debido a la efectividad, su bajo costo, su escasa residualidad y su inocuidad ambiental.

En este trabajo se aislaron y se identificaron a partir de características macroscópicas y microscópicas, dos aislados de hongos determinados como *Mycosphaerella* sp. aislado 1, *Mycosphaerella* sp. aislado 2 y *Fusarium* sp. en plantas enfermas de plátano y sobre los cuales se evaluaron 8 extractos etanólicos obtenidos a partir de cuatro especies de plantas del género *Piper*. Se evaluó el efecto de los extractos sobre el crecimiento micelial de los hongos. Los resultados mostraron una reducción del crecimiento micelial mayor al 50% a la dosis evaluada

de los extractos codificados como P1H, P1T y P7H, P7T, lo que representa un potencial de estudio en cuanto a los metabolitos presentes en los extractos y a la formulación de productos a base de estos extractos para futuros estudios de validación en planta.

INTRODUCCIÓN

En Colombia, la exportación de plátano y banano ocupa el tercer lugar, solo después del café y las flores, sin embargo, estos niveles de exportación son afectados en gran medida por los problemas fitopatológicos (AUGURA, 2015). Entre los fitopatógenos que afectan el banano se encuentran, *Mycosphaerella fijiensis* agente causal de la Sigatoka Negra. Esta enfermedad es considerada la más importante y con mayor relevancia a nivel mundial (FRAC, 2014). Debido a la susceptibilidad de este cultivo a la enfermedad se requiere el uso de múltiples fungicidas a frecuencias relativamente altas con costos estimados en más del 30 % del total de los costos de producción (Sepúlveda-R, 2015). Por otra parte, la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* es a nivel mundial una de las enfermedades más relevantes, ampliamente distribuida y de mayor impacto en cultivos de banano y plátano (Cardona-Piedrahita y Castaño-Zapata, 2019). *Fusarium oxysporum* tiene su origen en el sudeste asiático, aunque la enfermedad fue reconocida por primera vez en otros lugares ha coevolucionado junto a las musáceas en su centro de origen. Se han calculado pérdidas en más de 80 000 ha de cultivo del clon Gros Michel destruidas por la raza 1, lo que determinó su cambio por clones del subgrupo Cavendish (AAA). Los clones Cavendish se afectaban solo en los subtrópicos, pero la aparición más recientemente de la raza 4 tropical, ha causado importantes pérdidas en plantaciones de Malasia e Indonesia. Su entrada eventual a las plantaciones de Cavendish de América tendría un gran impacto económico y social (Batlle Viera y Pérez Vicente, 2009).

La producción de plátano y banano en Latinoamérica, actualmente se encuentra amenazada por una nueva raza del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc R4T). Esta raza es particularmente devastadora porque ocasiona marchitez, muerte de la planta y permanece por décadas en el suelo, haciendo difícil su manejo. La eventual llegada de Foc R4T al continente americano y particularmente a Colombia, donde la producción de banano y plátano es renglón estratégico en la económica campesina y donde estas especies constituyen una fuente básica de alimento en cientos de hogares colombianos, ha generado la necesidad de implementar

acciones preventivas a fin de mantener el estatus de ausencia de esta enfermedad en el país, entre estas la investigación de nuevos productos innovadores para su control (Instituto Colombiano Agropecuario, 2019).

Los fungicidas químicos son la principal alternativa para el control de estas enfermedades que afectan a los cultivos de musáceas, y en especial en el manejo de hongos fitopatógenos responsables de la destrucción de cultivos de plátano y banano, donde las pérdidas pueden ascender al 90%. El uso de agroquímicos convencionales ha venido en aumento, y por ende, los daños causados al medio ambiente, en especial a la microfauna, y a la salud del agricultor por el uso excesivo de químicos (ICA, et al., 2012). En los últimos años los estudios se han enfocado en implementar mecanismos de control contra afectaciones a los productos agrícolas, en donde se estudia las prácticas amigables con el medio ambiente y con el mismo cultivo agrícola afectado por enfermedades y plagas empleando productos a base de principios activos naturales que no afectan a microorganismos benéficos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En 2018 la producción mundial de plátano fue de 58 millones de toneladas, en una superficie cultivada de aproximadamente 5,643,474 hectáreas, con un rendimiento de 5,748,673 hectogramo/hectáreas (FAOSTAT, 2019).

Colombia es el segundo productor mundial de plátano con 2.7 millones de toneladas anuales; sin embargo, esta cifra es baja si se tiene en cuenta que la producción mundial es de 27 millones de toneladas y que los países africanos producen cerca de 19 millones de toneladas por año, con cinco variedades de plátano: Dominico, Dominico Hartón, Hartón, Cachaco o Popocho y Pelipita. El Urabá, norte y suroeste del departamento de Antioquia son las principales regiones cultivadoras de plátano de Colombia con 63,733 hectáreas (Piedrahita, 2019). El cultivo de plátano, ha sido un sector tradicional de la economía campesina, con alta dispersión geográfica y gran importancia socioeconómica desde el punto de vista de generación de empleo y seguridad alimentaria, en el Suroeste Antioqueño el cultivo de plátano es utilizado tanto en sombrío transitorio como permanente en sistemas de siembra en asocio con café y, la variedad establecida es la Dominico Hartón. En el Suroeste Antioqueño prima el clima templado, el cual es factible para los cultivos de plátano en una zona de vida de bosque muy húmedo montano bajo (González, 2018)

El 97% de los plátanos comercializados internacionalmente provienen de una sola variedad, la Cavendish. Esta falta de variedad genética significa que las plantas son altamente susceptibles a las plagas y patógenos. Entre los agentes que impactan negativamente los cultivos de plátano, se encuentra, el género *Fusarium*, el cual es un género de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. La enfermedad en plátano es considerada devastadora, por las pérdidas que ocasionó en Gros Michel, obligando al reemplazo de este cultivar por Cavendish, el cual, está siendo amenazado actualmente por la raza tropical 4 del hongo que, aunque aún existen reportes de su presencia en la Guajira, representa una amenaza mundial. (López-Zapata y Castaño-Zapata, 2019). Otro de los hongos de gran importancia es la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*), agente causal de la enfermedad foliar más destructiva y de mayor valor económico en los cultivos de

banano y plátano que puede causar pérdidas de hasta un 50% en el rendimiento. Sin medidas de control la Sigatoka Negra puede reducir hasta en un 50 % el peso del racimo y causar pérdidas del 100 % de la producción debido al deterioro en la calidad (Guzmán, 2012).

Para el manejo y control de estos agentes fitopatógenos se hace necesario la aplicación de grandes cantidades de fungicidas a los cultivos. Entre los pesticidas más comunes se incluyen los fumigantes y no fumigantes, los fumigantes son productos químicos volátiles entre los que se incluye el 1, 3 – Dicloropropeno y los plaguicidas de uso general tales como bromuro de metilo, cloropicrina y metil – isocianato que son en realidad biocidas de amplio espectro que controlan nematodos, hongos y malas hierbas (Andrés, 2002) (Andrés, 2002). En varios países los dueños de las plantaciones gastan más dinero en agroquímicos que en su mano de obra, además de que su alto consumo puede generar un impacto en los canales de agua y suelo, lo que resulta en la muerte de peces y la destrucción de otras formas de vida acuáticas y terrestres incluyendo los arrecifes de coral evitando que otras especies beneficiosas se reproduzcan y crezcan junto al cultivo, las cuales funcionan como un comportamiento simbiótico (Bananalink, 2019). Debido a la presión generada por los entes regulatorios, el uso de sustancias químicas se está limitando y restringiendo en la mayoría de los países, por lo que es necesario reemplazar estos agentes por productos amigables y menos tóxicos para el agricultor (Mesa et al., 2019). La innovación actual plantea la importancia de reemplazar los productos químicos por productos biotecnológicos con actividad antifúngica, los cuales no causan ningún daño o afectación al medio ambiente, hábitat de otros organismos como la microfauna beneficiosa de los cultivos infectados, además de que protege la salud del agricultor.

Debido a estos problemas en el cultivo de plátano, se han venido estudiando algunos bioinsumos más amigables con el medio ambiente, dentro de las alternativas para el reemplazo de los agroquímicos de uso actual se están empleando extractos naturales de plantas, los cuales se ha comprobado que tienen actividad antifúngica y que en algunos casos se han formulado y han aplicado como

productos biológicos. El empleo de extractos vegetales para el control de plagas, enfermedades y arvenses en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa promisorio, debido a su efectividad, bajo costo y bajo impacto en el ambiente. Alrededor de 3000 compuestos naturales de origen vegetal han sido reportados mostrando actividad bactericida, fungicida, insecticida, repelente y nematocida. (Chica, et al., 2004).

Los extractos de origen vegetal se caracterizan por la presencia de metabolitos secundarios los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas, y que pueden ser agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides. Dichos compuestos le proporcionan importantes características a los extractos, como son antialimentarios, antivirales, antimicrobianos, repelentes, inhibidores de germinación de semillas que permiten su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad y su producción alimentaria, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables. (Regnault-Roger et al., 2006)

Una de las familias estudiadas por la diversidad de sus metabolitos es *Piperaceae*. Esta familia, tiene una amplia distribución en zonas templadas y tropicales del mundo (Jaramillo and Manos, 2001). Dentro de esta familia, el género *Piper* cuenta con alrededor de 2000 especies, representadas en tres regiones geográficas: América (1300 especies), Asia (600 especies) y el Pacífico Sur (100 especies) (Quijano-Abril et al., 2006), (Abreu, et al., 2012). La importancia económica de esta especie, radica principalmente en sus aplicaciones ornamentales, médicas y agrícolas (Dousseau et al., 2014; Gisele L. Oliveira et al., 2013). Se ha reportado el uso ancestral por poblaciones indígenas amazónicas, mediante maceraciones de sus tallos y hojas como insecticidas y antimicrobianos (Milliken y Albert, 1996). También se han demostrado una amplia variabilidad en sus metabolitos secundarios y en algunos casos relacionadas con su ubicación geográfica.

Con el fin de buscar fortalezas y soluciones al impacto sanitario de enfermedades en el cultivo de plátano, se busca generar nuevos productos a base de extractos vegetales del género *Piper*, y de esta manera poder impactar positivamente con el desarrollo de nuevos productos fungicidas, supliendo así las necesidades de la

población, en especial la de los cultivadores de plátano del suroeste antioqueño a través del desarrollo innovador de biocontroladores naturales derivados de extractos de plantas.

2. MARCO CONCEPTUAL O ESTADO DEL ARTE

Asia es uno de los principales productores de plátano con 58 millones de toneladas, seguido por Sudamérica con 15,291 toneladas junto con la producción de Norteamérica, África, Oceanía y Europa se estima en un porcentaje en toneladas de 7943 - 7232 – 951 – 425 respectivamente, para un total de producción de cultivo de plátano de 58,430 toneladas y los principales productores en importancia del cultivo de plátano son Uganda, Colombia, Ecuador, Haití y Costa Rica con una producción en toneladas de 9250 – 2597 – 894 – 290 -100, respectivamente, según reporte de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación).

En Colombia, la *Musa paradisiaca*, el cual corresponde al plátano para cocción, y la *Musa sapientum* o banano, abarca un área de 400,000 ha y genera ingresos que representan el 7% del producto interior bruto (PIB) del país, siendo de gran importancia socioeconómica desde el punto de vista de seguridad alimentaria y generación de empleo. Este es un cultivo estratégico para la seguridad alimentaria nacional constituyéndose en uno de los alimentos básicos más importantes a nivel socioeconómico por la oportunidad para la generación de empleos directos e indirectos, además de los ingresos que le puede aportar a la población rural. (León et al., 2015)

El plátano es cultivado en diferentes zonas agroecológicas (áreas de tierras clasificadas por sus atributos biofísicos, humedad, temperatura, duración del periodo de crecimiento) y la variedad Dominico Hartón se cultiva en la región cafetera, entre los 900 y 1500 msnm. ya que a altitudes mayores de 1600 m no presentan las condiciones adecuadas para obtener plátano de buena calidad. También, el crecimiento y la producción del plátano dependen del desarrollo progresivo de las hojas, las cuales deben mantenerse funcionales desde la emisión de la inflorescencia y durante el desarrollo de los frutos. Así, para obtener un racimo de buen peso y calidad, las plantas deben mantener como mínimo seis hojas funcionales desde la floración hasta los 45 días de edad del racimo.

Antioquia es el segundo departamento del país con mayor proporción de producción agrícola, pero no el de mayor rendimiento, alcanzó 3 millones 54 mil toneladas en

2013 cultivadas en 10,000 hectáreas, pero lo superó Valle del Cauca, donde en 8,000 hectáreas se produjeron 3 millones 187 mil toneladas de alimentos e insumos. En Antioquia el cultivo de plátano está representando un 67.7% en la producción nacional, ocupando el primer puesto en la producción de plátano seguido por Quindío y Caldas. En el Suroeste Antioqueño son pocos los registros que se tienen con relación a la producción de plátano, las categorías de peso más rentables en el suroeste de entre 15 y 20 kilogramos (6,967,000 pesos al año), mientras aquellos que menos ganan son los de la categoría de entre 20 y 25 kilos (4,821,000 pesos al año). (Castañeda, 2015)

El plátano se cultiva en diferentes áreas agroecológicas, desde 0 hasta 2000 msnm y temperaturas promedias entre 17 y 35°C. En el país se cultivan alrededor de 358 000 ha, con una producción total anual de 2.5 millones de toneladas de racimos, de las cuales 95% se dedican al mercado interno y el resto a la exportación. Los principales centros productores se encuentran en la Región Andina, donde se cultivan 231,000 ha (64% del área cultivada) que aportan 67% de la producción nacional. Otras regiones naturales de importancia para el cultivo son los de Orinoquía, el Pacífico, el Caribe y la Amazonía. Del área cultivada en plátano, 87% se encuentra como cultivo tradicional asociado con café, cacao, yuca y frutales, mientras que 13% está como monocultivo tecnificado (Rodríguez et al., 1999).

2.1 Enfermedades más comunes en el cultivo de plátano

Los hongos son organismos eucariontes unicelulares o pluricelulares que se desarrollan en sitios húmedos y con poca luz. Las células de los segundos se agrupan en filamentos llamados hifas que en conjunto recibe el nombre de micelio. Según Agrios, (2005); Urbina, (2011), los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes. La mayoría de las especies de hongos conocidas son estrictamente saprófitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Alrededor de 70 especies de hongos producen enfermedades en el hombre y casi el mismo número ocasiona enfermedades en los

animales, la mayoría de las cuales son enfermedades superficiales de la piel o de sus apéndices. Se considera que más de 9,000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas. (Contreras et al., 2016).

Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos parásitos ataca a uno o más tipos de plantas. Algunos hongos crecen y se reproducen sólo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedante, durante todo su ciclo de vida estos hongos se conocen como parásitos obligados o biótrofos. (Contreras et al., 2016).

2.1.2 Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum*)

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas. (Tapia, 2014).

El principal género que afecta los cultivos de plátano es *F. oxysporum*. Este hongo puede sobrevivir por más de 30 años en el suelo y en plantas infectadas, gracias a que forma una estructura de resistencia llamadas clamidiosporas (Instituto Colombiano Agropecuario, 2019). La forma de infección de este hongo es entrar a la planta a través de las raíces e invade el sistema vascular de la xilema del cormo y del pseudotallo, donde continúa moviéndose, desarrollándose e iniciando nuevas infecciones. Esto trae como consecuencia la obstrucción y taponamiento de los haces vasculares que reduce el movimiento de agua y nutrientes en la planta. En estados más avanzados de la enfermedad, el hongo produce grandes cantidades de estructuras reproductivas como conidias y clamidiosporas las cuales retornan al suelo cuando la planta muere y permanecen en dormancia por varios años (Instituto Colombiano Agropecuario, 2019).

La enfermedad ocasiona marchitez vascular y pudrición en semillas, raíces, tallos, cormos y tubérculos (Belalcázar, 1991 citado por ICA, 2012). El hongo *Fusarium oxysporum* causante del Mal de Panamá se encuentra naturalmente en el suelo, sobreviviendo por más de 30 años en forma de micelios y clamidiosporas como estructuras de resistencia (Agrios, 2006 citado por ICA, 2012). La sobrevivencia del

hongo es mayor en suelos de texturas arcillosas, francas y franco arenosas; desarrolla muy bien la enfermedad en suelos ácidos con deficiencia de potasio, alta humedad, mal drenaje y alto nivel de inóculo en el suelo. La infección es de carácter sistémico, es decir, el hongo penetra a la planta a través de las raíces terciarias, para luego pasar al sistema vascular del rizoma y del pseudotallo, invadiendo finalmente los vasos del xilema; desde allí se producen conidios, los cuales son llevados por los haces vasculares, originando nuevos puntos de infección en la planta, obstruyendo el movimiento del agua y de los nutrientes (Instituto Colombiano Agropecuario, 2019). En estados más avanzados de la enfermedad, el hongo crece fuera del sistema vascular de la planta y produce grandes cantidades de conidios y clamidiosporas, las cuales pasan al suelo para permanecer en estado latente por varios años; el ciclo se repite cuando las condiciones ambientales son óptimas para que las clamidiosporas germinen e infecten nuevas plantas (Davis, 2005; Nel, 2005 citados por ICA, 2012). La enfermedad se puede propagar a través de semillas o cormos provenientes de cepas afectadas, por movimiento de suelo contaminado, maquinaria agrícola, herramientas, corrientes de agua, vientos y el ser humano (Belalcázar, 2004 citado por ICA, 2012). Los síntomas externos producidos por la enfermedad del Mal de Panamá se reconocen por el amarillamiento de las hojas más adultas a lo largo del margen foliar que continúa hacia la nervadura central o vena hasta quedar las hojas completamente marchitas y de color café, pudiéndose presentar agrietamiento en la base del pseudotallo (Brandes, 1919; Stover, 1962, Thurston, 1989, citados por ICA, 2012); este síntoma puede confundirse con los producidos por deficiencia de potasio, especialmente bajo condiciones de sequía y frío (Moore, et al., 1995, citado por ICA, 2012). El color que desarrollan depende de la especie, y puede ser blanco, crema, rojo, púrpura. El micelio aéreo suele ser abundante. Las especies del género pueden producir tres tipos de esporas asexuales llamadas macroconidios, microconidios y clamidiosporas. El macroconidio es la espora principal en la caracterización. Su forma y tamaño varían según la especie. Los macroconidios pueden originarse a partir de estructuras especializadas, los esporodoquios, como así también en monofiálides, polifiálides o directamente a partir del micelio aéreo. El microconidio es un carácter taxonómico

primario y se considera su presencia o ausencia. Si está presente las características consideradas son forma, modo de formación, si están solos, en falsas cabezas, cabezas o cadenas. Pueden formarse en el micelio aéreo a partir de mono o polifiálides, pero no en esporodoquios. Otros caracteres taxonómicos primarios son clamidosporas, conidióforos y mesoconidios (Corpoica, 1999).

Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa – dextrosa - agar (PDA) a 25°C. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar (Booth, 1970).

2.1.3 Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*)

La Sigatoka Negra es la enfermedad foliar que representa la principal limitante en la producción de plátano y banano a nivel mundial; en Colombia fue detectada por primera vez en la región del Urabá, desde donde se ha expandido a las regiones más cálidas del país con presencia en cultivos de plátano y banano. La enfermedad afecta las hojas de la planta, reconociéndose por la presencia de un gran número de rayas y manchas, especialmente por debajo de las hojas, las cuales aceleran el secamiento y su muerte (Álvarez et al., 2013).

En consecuencia, los racimos y los frutos tienen un menor peso en comparación con los obtenidos de plantas sanas. Adicionalmente, infecciones severas de la Sigatoka Negra causan la madurez prematura del fruto (ICA, 2012; Álvarez, et al., 2013). Cabe anotar que la propagación rápida de la enfermedad se ha dado por el transporte incontrolado de hojas enfermas, los vientos y los ríos que, al desbordarse, arrastran material enfermo, que luego depositan en las riberas, infectando de esta manera plantas hospederas allí existentes (ICA, 2012). El ataque en plantas adultas se reconoce por la gran cantidad de rayas y manchas de color café a negro, las que se hacen más notorias por el envés o parte bajera de la hoja,

llegando a cubrir toda el área foliar, desde la tercera a la más joven de las hojas (Merchán, 1998, citado por ICA, 2012).

2.3 Alternativas con bioinsumos ecológicos

Una solución amigable para el medio ambiente es el uso de biofungicidas, es una alternativa de gran potencial para el control de plagas y enfermedades en los cultivos, es una opción más sustentable que los productos químicos (Vilela, 2019). Entre las diversas estrategias para lograr la sustentabilidad, en sentido amplio, es emplear agroquímicos más amigables. En la actualidad se utiliza cerca del 80% de los clasificados en banda verde y azul, esto significa que son los menos peligrosos. Uno de los procesos más acelerados es la obtención de moléculas o microorganismos de la naturaleza, estos son aptos para la defensa de los cultivos de plagas y enfermedades o que mejoren la nutrición favoreciendo la fijación de nitrógeno o solubilizando el fósforo u otros nutrientes. (Vilela, 2019)

Es necesario considerar que el aumento de la población ha hecho inevitable forzar nuestros suelos para que produzcan los alimentos suficientes; para ello es obligación proporcionar nutrientes que estos requieren, ya que este es el principal recurso productivo, y la pérdida de este implica graves problemas de degradación física, química y biológica. Todo esto trae graves consecuencias en el desequilibrio de los procesos de reciclaje de nutrientes, la pérdida de materia orgánica y de la fertilidad natural de los suelos, produciendo una menor nutrición vegetal y por ende, los sistemas agrícolas se vuelven dependientes en la aplicación de grandes dosis de fertilizantes y otros agroquímicos, esto amerita pensar en alternativas viables que permitan desarrollar una agricultura sustentable y resiliente, frente a los cambios adversos a los que se ven enfrentados en la actualidad, contribuyendo a la disminución en la contaminación ambiental, por lo que es importante utilizar bioproductos en la agricultura (Parada y Muñoz, 2015).

El manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE) es una alternativa viable que la Unión Europea definió como “la aplicación racional de una combinación de medidas biológicas, biotecnológicas, químicas, de cultivo o de selección de vegetales de modo que la utilización de productos fitosanitarios químicos se limite

al mínimo necesario para mantener la población de la plaga en niveles inferiores a los que producirían daños o pérdidas inaceptables desde un punto de vista económico”.

El manejo se establece bajo tres pilares fundamentales, los cuales garantizan un control y manejo específico de las plagas o enfermedades que atacan los cultivos agrícolas. (ICA, 2012). Estos pilares básicos para la prevención se centran en la aplicación de medidas directas para evitar el aumento desmedido de poblaciones que se conviertan en plaga; realizar rotación de cultivos y tener en cuenta su distribución, conocer el comportamiento de las plagas, llevar a cabo un adecuado manejo de la sanidad del cultivo, realizando de manera oportuna labores agronómicas como destronque, desguasque, deshoje, deshije y plateos, una buena fertilización y riego, evitando la aplicación indiscriminada de pesticidas para proteger la entomofauna benéfica (Martínez, 1998)

El monitoreo es la inspección sistemática de un cultivo y sus alrededores para detectar la presencia de una plaga o enfermedad, el estado biológico de la plaga y la intensidad (incidencia y severidad). Si estas medidas son insuficientes, puede considerarse el uso de productos fitosanitarios. Cuando los monitoreos indican que se ha sobrepasado un umbral de daño económico, pueden emplearse distintos controles de MIPE (Manejo integrado de plagas y enfermedades) para prevenir impactos económicos en los cultivos o que la plaga o la enfermedad se extienda a otros cultivos. Para todos estos manejos se llevan diferentes controles, todo esto dependiendo de la gravedad o intensidad de la enfermedad o plaga, llevando registros de los controles evitando que esta se propague a las demás plantaciones. (ICA, 2012)

2.4 Plantas del género *Piper*

Piperaceae es una familia de distribución pantropical, con cinco géneros y cerca de 3500 especies. En Colombia se registran los géneros *Piper*, *Peperomia* y *Manekia*. En *Piper*, tres amplios clados, cada uno con un componente geográfico particular, han sido definidos: Neotropical (1300 spp), Asia-Tropical (600 spp) y Pacífico-Sur (10 spp).(Trujillo y Posada, 2015).

La familia *Piperáceae* comprende un número extenso de especies entre árboles, arbustos, hierbas, lianas o bejucos que se encuentran en lugares oscuros y frescos de todo el mundo, algunas especies son trepadoras, pueden presentar hojas simples, alternas, olorosas en ocasiones salen en parejas o en grupos de más de dos en el mismo punto de la rama, presentado una gran variación en su forma y en el tamaño. Su tallo forma una red de túbulos tendida por el vegetal en todas las direcciones, llamado sistema libero leñoso. Su reproducción puede ser bisexual o unisexual, presenta inflorescencia de tipo espiga con raras excepciones, terminal, axilares o frente a las hojas (Jara, 2013).

Especies del género *Piper* (*Piperaceae*) han sido empleados como insecticidas y fungicidas, a su vez compuestos aislados de ellas como amidas, fenilpropanos y terpenos presentan actividad antifúngica comprobada, por lo que estas especies pueden ser fuentes de nuevos antifungicos (Rahman et al., 2011). También han sido empleadas para el tratamiento de las enfermedades parasitarias, específicamente en la malaria y la leishmaniasis en la medicina tradicional boliviana, también son usadas estas plantas como bebida refrescante y relajante (Mesa A, et al., 2019). Las raíces y frutos son útiles para tratar el asma, la bronquitis, el dolor de abdomen, como estimulante y para curar afecciones hemorroidales. En América Latina, la especie *Piper amalago* es usada para aliviar ciertos dolores de pecho y se usa como agente antiinflamatorio. (Fernández y Abdo, 2016) (Mesa, et al., 2012)

En China utilizan varias de las especies de este género como la especie vegetal *Piper brachystachyum* con propiedades insecticidas (Flores, 2007)

En el Chocó y en toda Colombia son muchas las especies del género *Piper* que son utilizadas como medicinales con actividad antiinflamatoria o antibiótica y antimicrobiana. (Pino Benítez, 2008). Algunos usos explorados y reportados en la literatura para diversas especies de *Piper* son: antimutagenico, antioxidante, antibacteriano, antifúngico, antiparasitario, anticancerígeno, analgésico, antiinflamatorio, anti-asma, hipotensor, insecticida. (Cardona et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de extractos de plantas del género *Piper* en hongos fitopatógenos aislados de plátano en el Suroeste Antioqueño.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar y cultivar hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Mycosphaerella fijiensis* de plantas de plátano en el Suroeste Antioqueño.
- Caracterizar fenotípicamente los aislados de hongos fitopatógenos.
- Evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de los extractos etanólicos de dos especies de *Piper* sobre los hongos aislados de plátano.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Colecta de los hongos fitopatógenos

4.1.1 Material vegetal

El material vegetal fue colectado a partir de tejido foliar sintomático de fincas bananeras en los municipios de Andes y Jardín, Suroeste Antioqueño. La colecta se realizó en cultivos de plátano, en la cual se observaba sintomatología de infección por los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Mycosphaerella fijiensis*. Se tomaron muestras vegetales con síntomas de la enfermedad, obtenidas durante los meses de julio y agosto del 2019, de tres fincas bananeras, dos en el municipio de Andes y una en el municipio de Jardín.

Las muestras colectadas fueron colocadas en bolsas ziploc y llevadas al Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del grupo AgroBiotecnología del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia para su procesamiento.

4.1.2 Diseño experimental para la colecta de foliares en cultivo de plátano

El diseño experimental se realizó a partir de las siguientes consideraciones:

1. *Muestreo de plantas enfermas*: en la identificación del Mal de Panamá, los síntomas son: amarillamiento, hojas secas, desde las hojas más viejas hacia las más jóvenes. Decoloraciones de los pecíolos, que en estados avanzados provocan la caída de las hojas y su muerte. Entrenudos más cortos, reducción de la lámina foliar, malformaciones en hojas jóvenes. Las plantas enfermas producen racimos pequeños y frutos "habichuelados", sin valor comercial, por falta de llenado al carecer de una superficie foliar adecuada y una obstrucción del sistema vascular.

Para la identificación de Sigatoka Negra, pequeñas lesiones o puntos de color blanco-amarillento a marrón, de 1 mm de longitud, denominadas pizcas, apenas visibles en el envés de las hojas. Rayas o estrías de color marrón, las rayas o estrías se alargan y amplían dando la impresión de haber sido pintadas con pincel, sin bordes definidos y de color café, manchas ovaladas de color café en el envés y negro en el haz. Manchas negras rodeadas de un anillo negro y a veces un halo amarillento, centro seco y semihundido de coloración marrón clara, rodeadas de tejido clorótico (López-Zapata y Castaño-Zapata 2019).

2. *Zona del muestreo*: Cada finca se muestreo de forma independiente cuyos individuos estuvieron representados por las múltiples esporas o individuos producidos en el ciclo infeccioso de la enfermedad dentro de la parcela con aproximadamente 150 árboles.
3. Relación fenotípica que se repite entre individuos, indicando que probablemente exista una relación entre estos rasgos.

4.2 Aislamiento, mantenimiento y caracterización fenotípica en laboratorio de los hongos fitopatógenos

4.2.1 Cultivo, aislamiento y mantenimiento de *Fusarium oxysporum* y *Mycosphaerella fijiensis*

El procesamiento de las muestras en el laboratorio se realizó de acuerdo a la metodología descrita por N. Morales Restrepo (2018) con algunas modificaciones (Morales Restrepo y Cardona Castro, 2018). En forma general se realizó limpieza, desinfección, corte y siembra de las hojas y pseudotallo, con signos y síntomas de las enfermedades en estudio.

Para el aislamiento de hongos a partir de fragmentos de pseudotallo y follaje se realizó una desinfección externa con lavados sucesivos de la siguiente forma: Hipoclorito de sodio al 1% por triplicado, agua destilada estéril (ADE) por tres

minutos, seguido por etanol al 70% por un minuto y ADE por tres minutos; con el fin de eliminar los microorganismos presentes en el rizoplaneo y proceder al aislamiento de los hongos estudiados. Los trozos de pseudotallo y follaje esterilizados se sembraron en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) de la siguiente manera: Por cada planta se sembraron 4 trozos de pseudotallo y follaje de aproximadamente de 1,0 cm de diámetro en 3 cajas Petri por triplicado y se sembraron controles con 5 gotas de ADE del último lavado del proceso de desinfección. Se usó PDA acidificado con ácido acético para evitar el crecimiento de bacterias. A cada caja Petri se le realizó un seguimiento durante 5 días. Los hongos que crecieron a partir de los trozos de pseudotallo y follaje fueron aislados y replicados en PDA acidificado hasta obtener cultivos puros.

4.3 Identificación de *Fusarium oxysporum* y *Mycosphaerella fijiensis*.

4.3.1 Técnica de microcultivo

La técnica de microcultivo es un procedimiento idóneo para la identificación de estructuras fúngicas, ya que permite visualizar al microscopio el micelio en su conjunto. La técnica de microcultivo consiste cortar con una hoja de bisturí una porción de aproximadamente 1 cm² de un medio de cultivo sólido y colocar esta porción de agar sobre un portaobjetos estéril e inocular con un asa estéril pequeñas fracciones del hongo en el centro del cuadro de medio de cultivo. Cubrir el microcultivo con el cubreobjetos estéril y colocar el microcultivo dentro de una caja de Petri estéril, sobre una varilla de vidrio doblada, y agregar suficiente glicerina al 20%, sin descubrir el portaobjetos. Incubar a 26° - 28°C durante 3 días a 5 días y observar al microscopio, tomando el cubreobjetos del microcultivo con una pinza flameada en alcohol de 70% y colocando sobre una gota de medio montaje (como alcohol polivinílico o azul de lactofenol) en un portaobjetos (Morales y Cardona, 2018).

Se hicieron microcultivos para todos los aislamientos, con tres repeticiones por aislamiento (Morales Restrepo y Cardona Castro, 2018)

4.3.2 Variables fenotípicas evaluadas

Se hizo una descripción de los aislados a partir de las siguientes características macroscópicas y microscópicas:

- 1) Número de tubos germinativos (Un solo tubo germinativo, dos tubos germinativos de similar longitud o dos tubos germinativos desiguales en el cual uno mide menos de la mitad del otro)
- 2) Ramificación del tubo germinativo (Tubos germinativos con ramificaciones o sin ramificaciones)
- 3) Color del micelio (Color blanco, rosa, beige)
- 4) Morfología del micelio (división circular sobre el micelio, división paralela sobre el micelio, división de forma irregular y división de forma indefinida).
- 5) Presencia de exudado (exudado presente o ausente)
- 6) Forma del micelio (ovoide o indeterminada “amorfa”).
- 7) Medición del crecimiento del hongo (determinación del crecimiento radial por día)

4.4 Obtención de extractos a partir de género *Piper*

Las plantas de *Piper* se secaron a temperatura ambiente en un sitio con buena ventilación y sin exposición directa al sol, durante 10 días, posteriormente se molió el material en un molino industrial hasta tener un tamaño de partícula de 5 mm para iniciar el proceso de extracción. Se llevó inicialmente 200g de cada planta a un proceso de percolación hasta agotamiento (5 días/3 veces), utilizando etanol (E) como solvente. Posteriormente, se filtró y se concentró el extracto en un rotavaporador hasta sequedad para obtener los extractos etanólicos codificados como P1H –P1T, P2H – P2T, P6H – P6T, P7H – P7T (Mesa, et al., 2015). Todos los extractos se almacenaron a temperatura ambiente para los ensayos de actividad antifúngica y hacen parte del banco de extractos del grupo de agrobiotecnología por lo que la identificación de la especie de planta se reserva por confidencialidad del proyecto.

4.5 Evaluación de la actividad antifúngica

4.5.1 Prueba de inhibición del crecimiento micelial por el método de difusión por discos.

En este procedimiento las placas de PDA se inocularon con un inóculo estandarizado de cada uno de los hongos aislados en la sección anterior (un disco de la zona de crecimiento de un cultivo del hongo de 5 días se colocó en el centro de la caja de Petri de 9 cm de diámetro). Luego, discos de papel filtro (de aproximadamente 6 mm de diámetro), que contenían los extractos de ensayo a una concentración de 1000 µg/disco, se colocaron sobre la superficie del agar a 2.5 cm del disco del hongo (el número de discos de extractos no fue mayor a 6), se usaron como control negativo discos con DMSO y como control positivo discos con el fungicida más usado en campo. Las placas de Petri se incubaron a 28 °C, y se hicieron evaluaciones a las 24 h de cultivo (Talero et al., 2019).

El crecimiento fúngico (diámetro de la colonia) fue medido y el porcentaje de inhibición calculado de acuerdo con la fórmula:

$$\% I.C.M = \frac{(CC-CT)}{CC} * 100$$

Donde:

% I.C.M. = es el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio.

CC = es el crecimiento radial del micelio en la caja de Petri correspondiente al control.

CT = Es el crecimiento radial del micelio enfrente al disco.

4.6 Análisis estadístico

Los datos de las medidas tomadas se les obtuvo la media y la desviación estándar por día, estos datos fueron sometidos a la prueba de normalidad, y las diferencias entre tratamientos se analizaron mediante un diseño experimental completamente al azar ANOVA en el programa GraphPad Prism 8.3.0.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Colecta de los hongos fitopatógenos

Todo el material vegetal fue extraído de cultivos de musáceas en los municipios de Andes y Jardín, Antioquía. Se seleccionaron plantas que presentaran la sintomatología de las enfermedades causadas por los hongos de interés, síntomas como hojas marchitas, amarillamiento de las hojas adultas por todo el margen foliar, observar posible agrietamiento en la base del pseudotallo, observación de rayas y manchas de color café a negro que pueden cubrir toda el área foliar.

La colecta de material vegetal se hizo mediante la búsqueda, en las fincas plataneras seleccionadas, ubicadas en los municipios de Andes donde se muestrearon 2 fincas (Finca La Italia y El Líbano) y en Jardín donde se seleccionó 1 finca (Finca La Humildad), de plantas que presentaran una sintomatología propia de Mal de Panamá y Sigatoka Negra. Estas muestras están correlacionadas con las dos cepas de *Mycosphaerella* en el municipio de Jardín y una cepa de *Fusarium* aislada en el municipio de Andes, como las que se muestran en la Figura 2. En donde se evidencia la presencia de hongos por medio de afectaciones causadas a la planta, cabe resaltar que los hongos aislados fueron tomados de plantas diferentes, no se presentó una planta donde se encontraran ambos hongos coexistiendo juntos, sin embargo, no se descarta que estos hongos fitopatógenos coexistan en la misma planta.



Figura 2. A. Plantas con sintomatología del hongo *Fusarium* sp. B. Musáceas con sintomatología del hongo fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*. C. Parcela con cultivo de musáceas, las cuales presentan problemas fitosanitarios.

En la enfermedad causada por el hongo *Fusarium oxysporum* con presencia en el municipio de Jardín, los síntomas externos se caracterizan por un amarillamiento de las hojas más adultas a lo largo del margen foliar que continúa hacia la nervadura central hasta quedar las hojas completamente marchitas y de color café; puede o no manifestarse un agrietamiento en la base del pseudotallo. En sus inicios este síntoma puede confundirse con los producidos por deficiencia de potasio, especialmente bajo condiciones de sequía y frío. Todas las hojas se agobian en la unión del peciolo con el pseudotallo, quedando colgadas de las plantas.

En cuanto a la sintomatología de la Sigatoka Negra causada por hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* la enfermedad puede ir evolucionando por varios estadios, se colectó materia vegetal en el municipio de Andes, de acuerdo con las lesiones pequeñas de color amarillento menores de 1mm de longitud; que aparecen únicamente en el envés, no visibles a trasluz, similares al estado 1 de la Sigatoka Amarilla. Se colectaron aquellas que tuvieran rayas de 2-3mm de longitud de color café rojizo visibles primero en el envés; también con síntomas en el haz en forma de rayas que cambian con el tiempo a café y luego negro. En este estado se inicia la formación de conidios, cuya producción se prolonga hasta la iniciación del estado. Las rayas o estrías se alargan y amplían; en condiciones desfavorables pueden alcanzar de 2 a 3cm de longitud. Manchas necróticas de forma elíptica, de color café en el envés y negro en el haz. Manchas negras rodeadas a veces de un halo amarillento y centro ligeramente hundido. Manchas con el centro hundido, de color gris, rodeados por un anillo negro, bien definido y un halo amarillo brillante, a simple vista se pueden observar los peritecios. Las manchas son visibles en hojas secas porque el anillo persiste. Tal cual se puede evidenciar en la Figura 3, en donde se puede observar líneas de color marrón a negro, esto evidencia una lección propia de Sigatoka Negra, en donde se ve la herida causada por este hongo en la zona foliar.



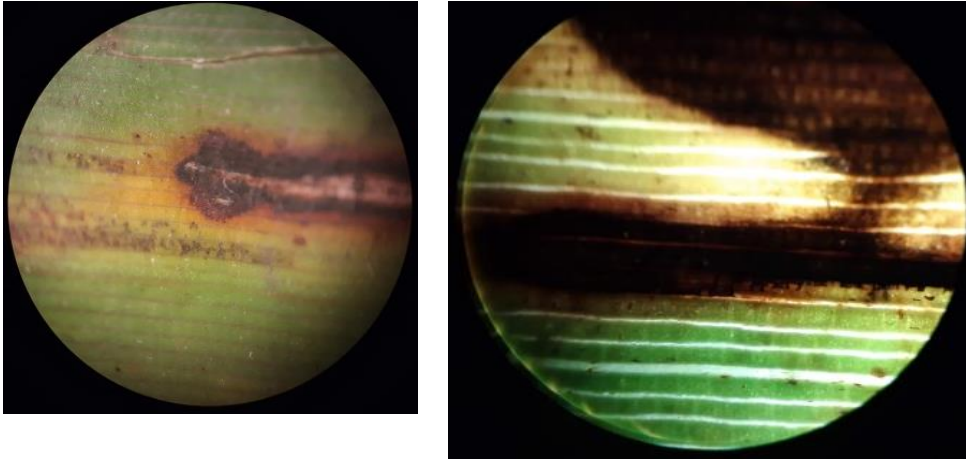


Figura 3: sintomatología propia de la enfermedad Sigatoka Negra causada por *Mycosphaerella fijiensis*.

En este muestreo se identificó plantas en el municipio de Andes con hojas con manchas cloróticas, las cuales se van tornando de color marrón y formando rayas delimitadas por las nervaduras de la hoja, esta sintomatología (Figura 3), se iba presentando con más frecuencia y mayor severidad en el municipio de Jardín en donde se pudo observar que la hoja se ennegrece y lucia empapada, esto se debe a las condiciones climáticas presentes en la zona, después de realizar este muestreo se procedió a coleccionar las hojas que presentaban estas características ya que es sintomatología propia del hongo fitopatogéno *Mycosphaerella fijiensis* por su afectación en la parte aérea de los cultivos de musáceas.

De igual forma se realizó un muestreo en ambos municipios para buscar plantas que presentaran afectación por hongos fitopatogénos del género *Fusarium*. Este hongo es muy conocido por la enfermedad causada denominada Mal de Panamá, el cual presenta diferentes razas las cuales pueden afectar a diferentes especies de musáceas, siendo en algunos casos devastadora y generando enfoque en los manejos de esta enfermedad. La sintomatología de este hongo se da principalmente en la parte del sistema vascular y en los tejidos del pseudotallo de la planta, se puede evidenciar en la Figura 4, sin embargo, hay evidencia que este hongo puede presentarse en el suelo y puede persistir por hasta 30 años, por esta razón se realizó coleccionada de pseudotallo y parte del sistema vascular de la planta.



Figura 4: Sintomatología de la enfermedad Mal de Panamá causada por el hongo *Fusarium oxysporum*.

5.2 Aislamiento y mantenimiento de los hongos fitopatógenos

En el procesamiento en el laboratorio se realizaron aislados, purificación de hongos y posterior caracterización, principalmente se hizo una limpieza a las hojas colectadas y se cortaron cuadros de 1cm², para los pseudotallos y tejido vascular se hicieron cortes de 1 x 1cm aproximadamente todos los montajes se hicieron en cajas de Petri servidas con agar papa dextrosa (PDA), las muestras ya inoculadas se llevaron a incubación a 28°C durante 24 horas, de igual modo se verificaban diariamente para observar alguna característica anómala en la dinámica de crecimiento y su comportamiento. Después de las 24 horas se pudo observar algún crecimiento del hongo, en este momento se puede evidenciar el crecimiento de diferentes cepas o especies de hongos, se observa en la Figura 6.

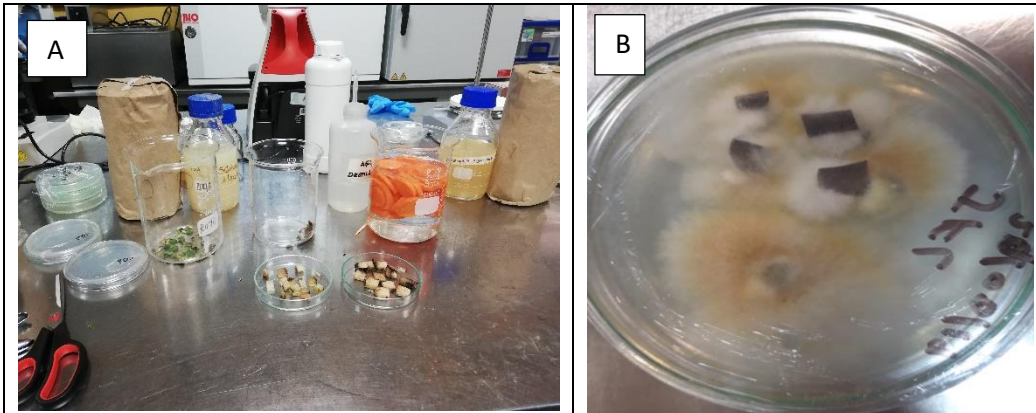
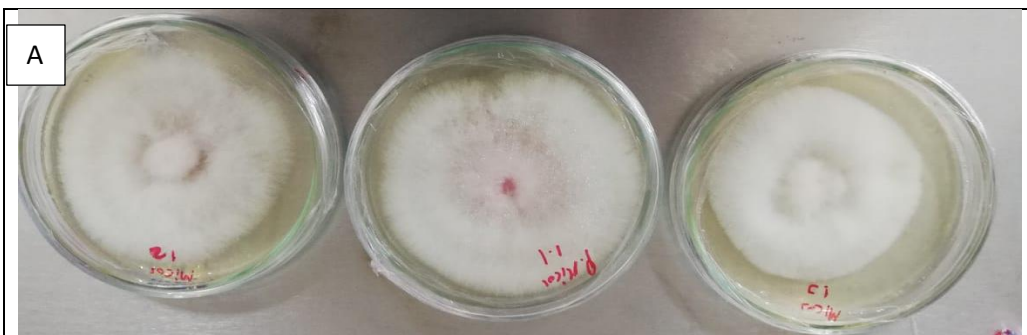


Figura 5. A. Preparación del material de colecta, medios para el aislamiento e implementos necesarios para el aislamiento de hongos. B. crecimiento de hongos en medio PDA. (A partir del crecimiento del hongo se hizo extracción de parte micelial para su aislamiento y purificación de una cepa del hongo en específico)

Se procedió a realizar aislados de estos separándolos en cajas de Petri individual y llevar un control en el crecimiento de más de dos hongos y seguir realizando aislados hasta obtener una cepa pura, así se procedía a realizar la caracterización y diferenciación fenotípica de los hongos fitopatógenos presentes en los cultivos de musáceas para posteriormente realizar tratamientos con los extractos vegetales y obtener inhibición de estos hongos por medio de biocontroladores a base de plantas, el tiempo necesario para el crecimiento del hongo era aproximadamente de 48 a 60 horas, en la Figura 6 se observa el crecimiento del hongo.



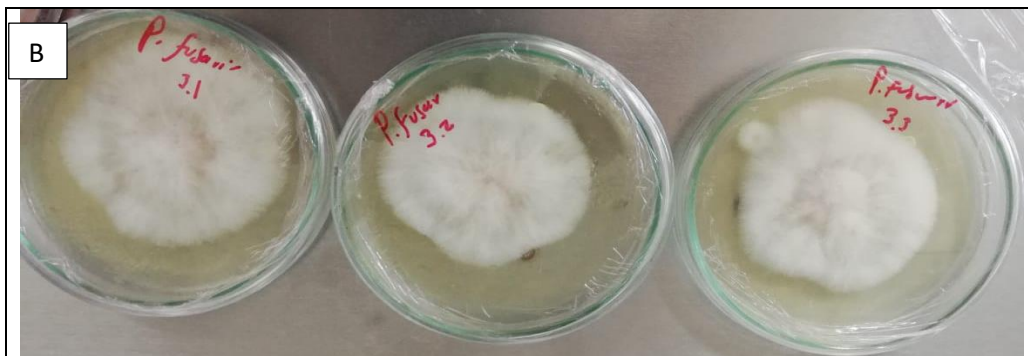


Figura 6. Se realizó el inóculo de los fragmentos de pseudotallo y hojas extraídos en cajas de Petri en medio PDA de los cultivos de musáceas enfermas. A. Crecimiento de *Mycosphaerella* sp. B. Crecimiento de *Fusarium* sp., se observaba a las 36 horas.

Los aislados se mantuvieron en condiciones idóneas para su crecimiento. Los hongos obtenidos se preservaron en cajas de Petri y en medio PDA, así se prevalece a que el hongo tenga sustrato para mantenerlo en óptimas condiciones en incubación a 28 °C. Después de 60 a 72 horas del cultivo se hicieron cultivos en tubos de ensayo con el fin de preservar los aislados hasta su uso en las pruebas de actividad antifúngica, la caja de Petri se llenó por completo por el crecimiento del hongo a las 96 horas después de haber realizado el inóculo.

Identificación de *Fusarium oxysporum* y *Mycosphaerella fijiensis*

5.3.1 Técnica de microcultivo

Se hicieron microcultivos de los aislados, con el fin de observar algunas características microscópicas del crecimiento del hongo, con el propósito de identificar estructuras propias de cada hongo, para tener evidencias para identificar a los hongos fitopatógenos presente en los aislamientos de los cultivos de musáceas, y por ende implementar los tratamientos necesarios con los extractos para la inhibición *in vitro* del crecimiento del hongo, la dinámica se puede observar en la Figura 7.

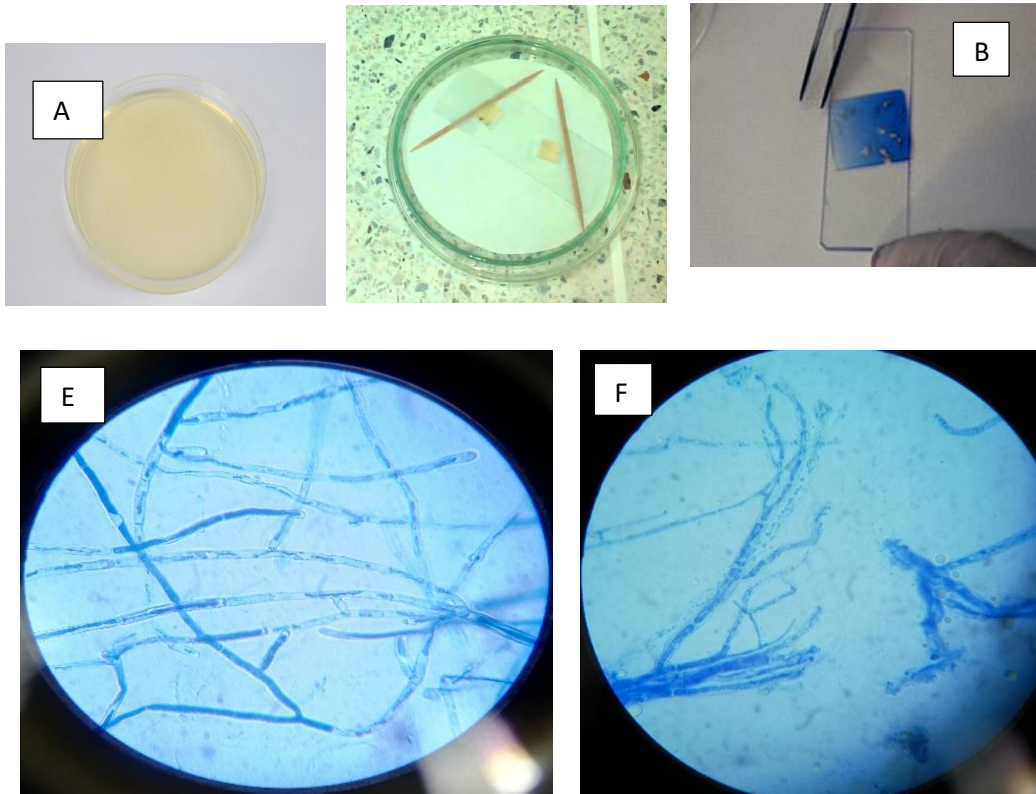
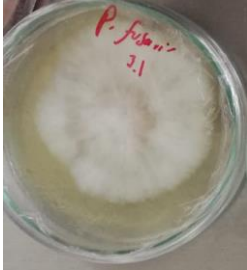







Figura 7. Materiales y resultados de microcultivo de hongos. A. Medio agar papa dextrosa PDA, medio dividido en cuadros de 0.5 cm. y material necesario para realizar el microcultivo, todo previamente esterilizado. B. Tinción realizada con azul de metileno para la observación de estructuras del hongo. E-F. estructuras observadas bajo microscopio a 100X, parte fundamental para la clasificación e identificación de hongos.

Con respecto a la forma del crecimiento y las características presentadas por cada uno de los hongos aislados se realizó una caracterización teniendo en cuenta variables fenotípicas tales como la longitud, la existencia de ramificaciones y el número de tubos germinativos, estas son representadas en la Tabla 1.

Tabla 1: Características fenotípicas de los aislados.

Características	Identificación taxonómica preliminar para <i>Fusarium</i> sp.	Identificación taxonómica preliminar para <i>Mycosphaerella</i> sp. aislado 1.	Identificación taxonómica preliminar para <i>Mycosphaerella</i> sp. aislado 2.
Imagen macroscópica del hongo			
Color del micelio (color blanco, rosa, beige)	Rosa	Blanco	Beige
Morfología del micelio (división circular sobre el micelio, división paralela sobre el micelio, división de forma irregular y división de forma indefinida).	Circular	Circular	Circular
Presencia de exudado (exudado presente o ausente)	No	Si	Si
Forma del micelio (ovoide o indeterminada "amorfa").	Ovoide	Amorfa	Amorfa
Crecimiento del hongo (masa celular o número de células)	Una o Dos células	Una	Una

Medición del crecimiento del hongo (determinación del crecimiento radial por día)	1,5 cm por día	2 cm por día	2 – 2,5 cm por día
Observación microscópica			
Número de tubos germinativos (un solo tubo germinativo, dos tubos germinativos de similar longitud o dos tubos germinativos desiguales en el cual uno mide menos de la mitad del otro)	Uno	Dos	Dos
Ramificación del tubo germinativo (Tubos germinativos con ramificaciones o sin ramificaciones)	No	Si	Si

Preliminarmente los hongos aislados, gracias a las características fenotípicas se pudo determinar que estos aislados pertenecían a los hongos fitopatógenos causantes de las enfermedades, Mal de Panamá y la Sigatoka Negra, causados por los hongos, *F. oxysporum* y *M. fijiensis*, respectivamente causantes de pérdidas de más del 90% en cultivos de musáceas.

Taxonomía de hongos aislados.

<i>Mycosphaerella fijiensis</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
Reino	Fungi	Reino	Fungi
Filo	Ascomycota	División	Deuteromycota
Clase	Dothideomycetes	Clase	Sordariomycetes
Orden	Capnodiales	Orden	Hypocreales
Familia	Mycosphaerellaceae	Familia	Nectriaceae
Género	<i>Mycosphaerella</i>	Género	<i>Fusarium</i>

5.4 Evaluación de la actividad antifúngica

A los extractos vegetales y compuestos obtenidos se les evaluó su potencial biológico en los diferentes modelos biológicos a nivel in vitro sobre los aislados. En su mayoría los métodos de evaluación biológica sobre hongos fitopatógenos consistió en la exposición del hongo a 1000 µg/disco de extracto en medio agar papa dextrosa con el fin de observar alguna dinámica de inhibición.

Los extractos empleados para las pruebas de inhibición fueron extraídos por medio de percolación, en donde se tomaban especies de *Piper* y se les hacía un procesamiento de todas las partes de la planta, para así obtener los extractos, en donde se codificaron y se mantuvieron en el banco de extractos del laboratorio de agrobiotecnología, donde se mantuvieron las especies empleadas bajo

confidencialidad, en este trabajo se evaluaron 8 extractos, de cuatro plantas, codificados así: P1H – P1T, P2H – P2T, P6H – P6T, P7H – P7T, en donde los extractos 1 y 2 representan una especie de dos plantas diferentes y 6 - 7 representa otra especie de dos plantas del género *Piper*, donde se representa las partes de la planta de *Piper* de dos especies de las cuales se realizaron extracciones de hoja y tallo.

En la Tabla 3 se puede observar los resultados de la actividad antifúngica de los extractos estudiados. Estos porcentajes obtenidos al realizar ensayos por triplicado de los hongos y observando la inhibición que causa del extracto en el crecimiento del hongo, la forma de evaluación del inóculo se representa en la Figura 8.

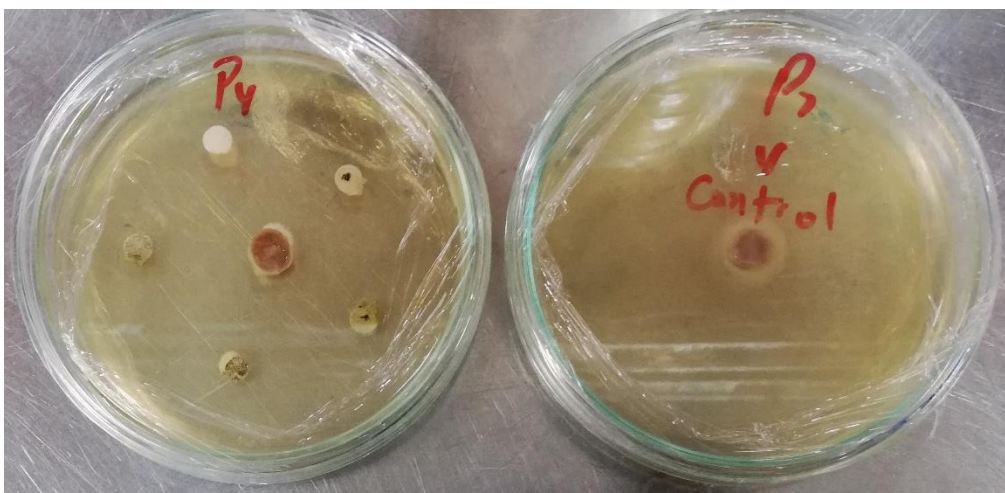


Figura 8. Forma de evaluación de los extractos a hongos fitopatógenos por triplicado y un control externo

Todos los porcentajes de inhibición obtenidos en las pruebas realizadas son una media obtenida por los ensayos por triplicado realizados a cada hongo, los cuales son sometidos a pruebas con extractos de *Piper*.

Tabla 3. Efecto *in vitro* de los extractos etanólicos de *Piper* spp. sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. y *Mycosphaerella* sp. aislados 1 y 2.

Código de muestra	% Inhibición <i>Mycosphaerella</i> sp. aislado 1	% Inhibición <i>Mycosphaerella</i> sp. aislado 2	% Inhibición <i>Fusarium</i> sp.
-------------------	--	--	----------------------------------

	X ± SD*	X ± SD	X ± SD
P1H	54,00 ± 2,82	64,35 ± 1,99	57,56 ± 5,44
P2H	34,00 ± 2,82	49,40 ± 1,99	38,27 ± 5,44
P1T	62,00 ± 2,00	64,35 ± 1,99	55,75 ± 1,92
P2T	44,00 ± 0,00	50,47 ± 3,98	41,93 ± 6,66
P6H	16,00 ± 4,00	27,36 ± 8,88	21,30 ± 6,15
P7H	49,33 ± 2,31	52,44 ± 4,44	41,98 ± 2,51
P6T	21,33 ± 4,62	21,22 ± 5,88	7,53 ± 6,15
P7T	36,00 ± 5,66	40,32 ± 8,88	41,25 ± 3,07

Nota: *Media ± Desviación estándar. Controles: Se llevó un control del solvente con Dimetilsulfóxido (DMSO) y control sin tratamiento

Durante todos los tratamientos realizados a los 2 hongos fitopatógenos se realizaron ensayos por triplicado en donde en cajas de Petri con medio PDA, se inocularon en el centro y con una distancia de 2,5cm del centro se colocaba un disco impregnado con un control de DMSO y luego teniendo una distancia de 2,5cm se inoculaba cada disco con extracto, manteniendo una distancia de 2,5cm para cada disco impregnado de extracto, tal cual se evidencia en la Figura 3, se realizaban pruebas con los extractos P1H – P1T y P2H – P2T, posteriormente se hacía con los extractos P6H - P6T y P7H – P7T.

En los resultados obtenidos se pudo evidenciar los porcentajes de inhibición causados por los extractos, en donde se demuestra un mayor porcentaje de inhibición en los extractos codificados con P1H, P1T y P7H, cuando se sometía al tratamiento con la cepa aislada de *Mycosphaerella* sp. aislado 1, los extractos P2H – P2T, P6H y P6T fueron los que presentaron una menor inhibición, obteniendo un porcentaje por debajo del 20% en la inhibición del crecimiento. Esta dinámica se presenta igual para los porcentajes de inhibición obtenidos en la evaluación de la actividad para *Mycosphaerella* sp. aislado 2, en donde se refleja que los extractos P1H, P1T y P7H son extractos prometedores para el control de la Sigatoka Negra. En los tratamientos realizados para la cepa de *Fusarium* sp. los resultados

obtenidos se observan que los extractos codificados P1H, P1T, P7H y P7T, presentan una inhibición en la actividad del crecimiento del hongo con porcentajes de más del 40%, por otra parte, se evidencia que el extracto P2T presenta una actividad significativa en la inhibición del hongo y el extracto con menor actividad para el tratamiento de todas las cepas fue el extracto codificado como P6H y P6T.

Cabe resaltar que todos los tratamientos relacionados con las pruebas de inhibición a los hongos aislados se realizaron por triplicado para disminuir los márgenes de error que pudieran existir en todo proceso biológico.

Estos datos fueron analizados en el programa estadístico y posteriormente representados por medio de gráficas. Donde se puede evidenciar en la Figura 9 y las Gráficas 1, 2 y 3.

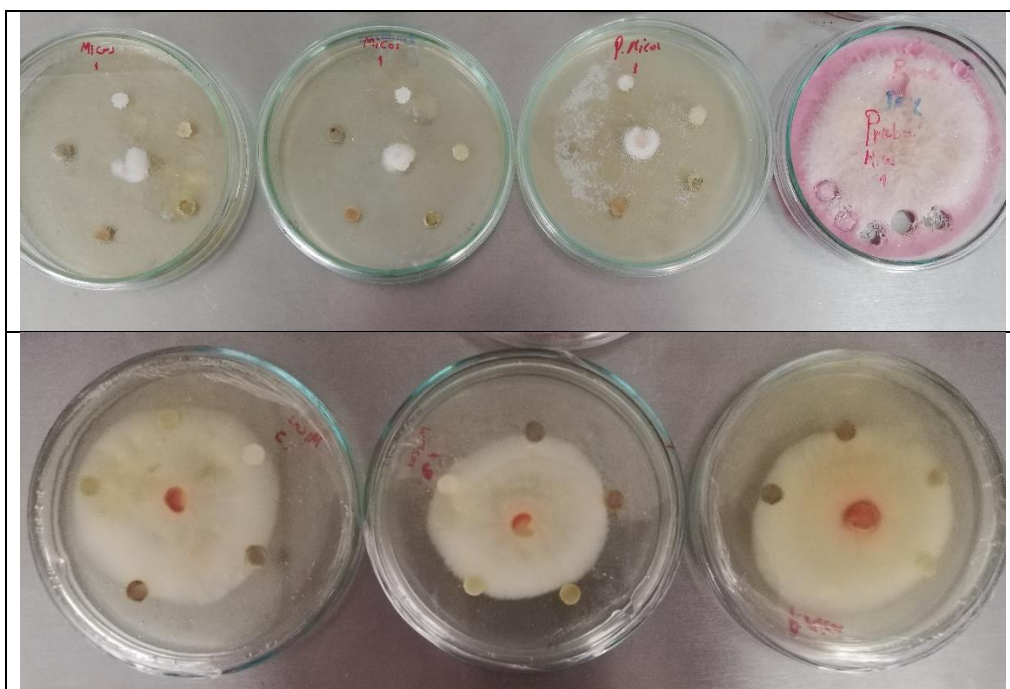
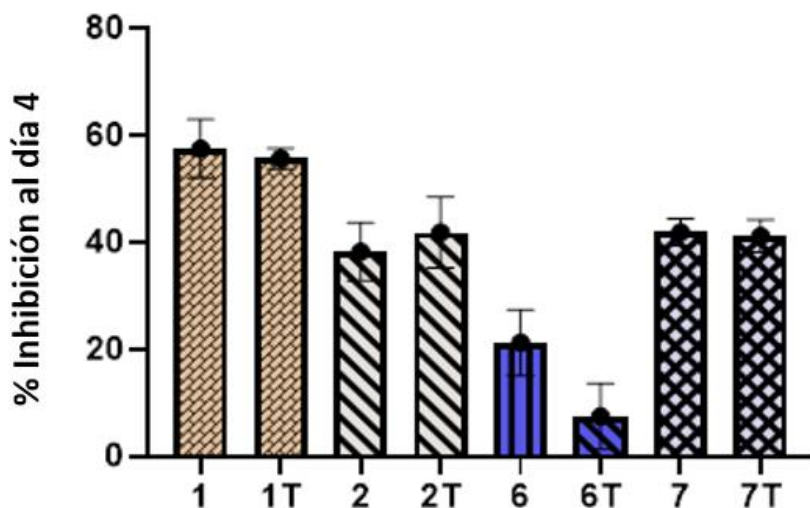


Figura 9. Disposición de los discos impregnados con los 8 extractos, de cuatro plantas, divididos en pruebas por separado de a 4 extractos por tratamiento, siempre teniendo un control de dimetil sulfoxido (DMSO) en el mismo tratamiento con los extractos y un control externo para evidenciar el crecimiento en condiciones normales.

En las pruebas de inhibición realizadas a la cepa identificada preliminarmente como *Fusarium* sp. obtenido de plantas enfermas de plátano, se pudo evidenciar una disminución en el crecimiento del hongo, se observa una mayor interacción

antifúngica en los tratamientos realizados con los extractos P1H y P1T, con porcentajes iguales a 60%, pero también se puede observar una actividad en el porcentaje de inhibición en los extractos P2T y P7H – P7T, porcentajes que se pueden evidenciar en la Gráfica 1, siendo los extractos P6H y P6T los ensayos con una menor actividad en la inhibición del crecimiento del hongo, cabe resaltar que las partes de la especie de *Piper* donde se realizó la extracción pueden presentar los mismos metabolitos debido a los resultados obtenidos.

Actividad antifúngica de extractos de *Piper* sobre *Fusarium sp.*

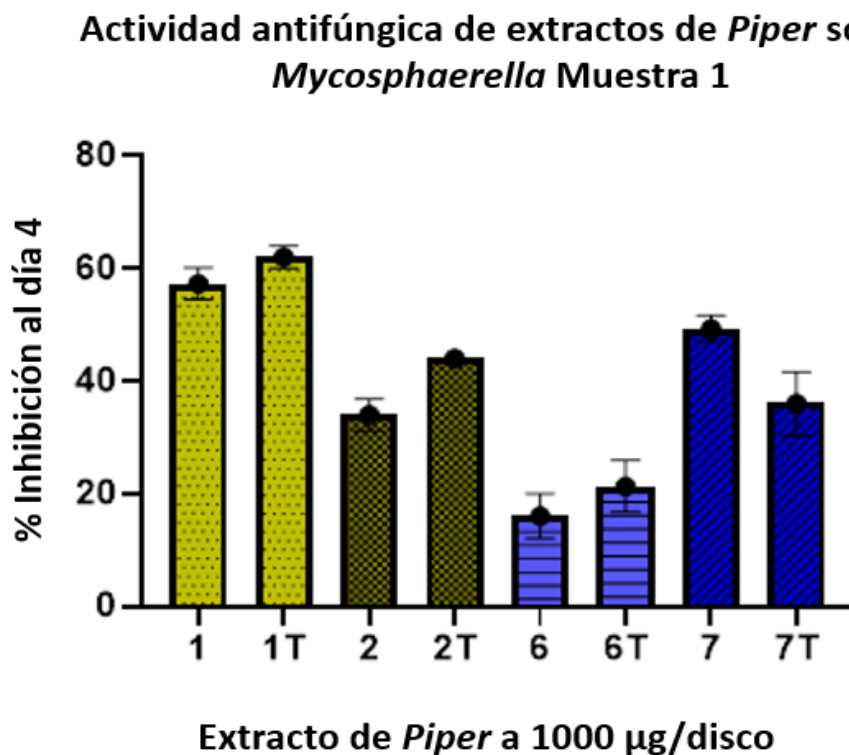


Extractos de *Piper* a 1000 µg/disco

Grafica 1. Representa el porcentaje de inhibición en el día 4 para el hongo del género *Fusarium*, para el tratamiento de los 8 extractos de cuatro plantas, evaluados a las 96 horas.

En las pruebas de inhibición realizadas al género de *Mycosphaerella* en la aislado 1, aislado de parte aérea de la planta de plátano, se observa una respuesta antifúngica muy alta en el extracto 1T con un porcentaje superior al 60%, siguiéndolo el extracto 1 donde el porcentaje es mayor al 55%, evitando así que el hongo crezca, Se da enfoque a que estos extractos pertenecen a la misma planta lo que se puede argumentar que los metabolitos allí presentes se encuentran tanto en las hojas como en el tallo. Se puede reflejar un porcentaje un poco menor en la inhibición del

crecimiento en los extractos P2T, P7H y P7T, presentan una inhibición superior al 50%, porcentaje importante para generar una respuesta negativa frente al crecimiento del hongo fitopatógeno, estos resultados son presentados gráficamente en la Gráfica 2.

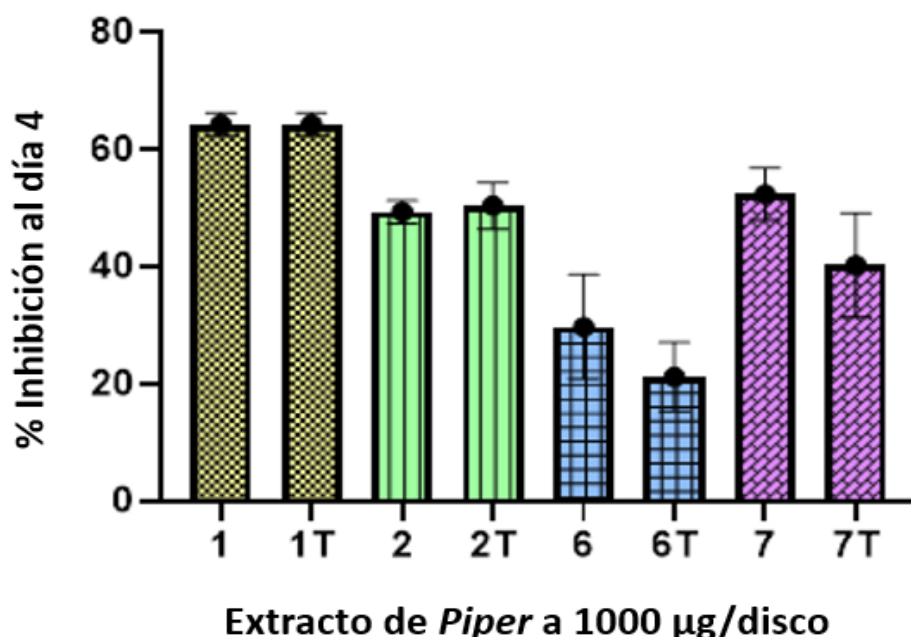


Grafica 2. Actividad antifúngica de extractos de *Piper* sobre *Mycosphaerella* aislado 1, se evidencia tratamientos con 8 extractos de cuatro plantas y los porcentajes de inhibición a las 96 horas.

En las pruebas de inhibición realizadas al género de *Mycosphaerella* en el aislado 2, en donde presentaba similitud en las características fenotípicas de *Mycosphaerella* sp. se trabajó como una cepa diferente, el cual se aisló de la parte aérea en los cultivos de musáceas, se observa una buena dinámica y mejor interacción con respecto a la disminución del crecimiento del hongo, existe mayor interacción con respecto a la respuesta antifúngica en los tratamientos realizados con los extractos P1H y P1T, obteniendo una inhibición de aproximadamente del 65% en la inhibición del crecimiento, también se puede observar una actividad menor en el porcentaje de inhibición en los extractos P2T y P7H – P7T en donde los porcentajes que van entre el 50 y 55% de inhibición en el crecimiento, estadísticas que se evidencian en la Gráfica 3 tras los ensayos realizados, son

resultados de gran expectativa, esperanzadores y de avance en el control de *Mycosphaerella* sp., se puede evidenciar que los metabolitos secundarios presentes en la especie de *Piper* codificada con P1H y P1T son de gran éxito para la formulación de antifúngicos de origen vegetal para el control de *Mycosphaerella* sp.

Actividad antifúngica de extractos de *Piper* sobre *Mycosphaerella* Muestra 2



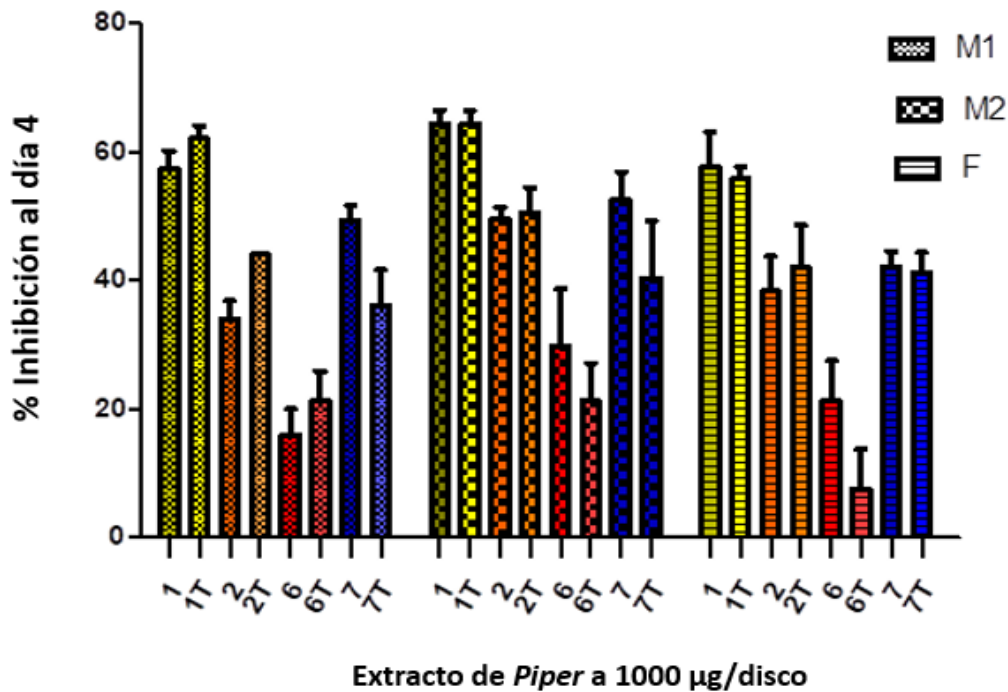
Gráfica 3. Actividad antifúngica de extractos de *Piper* sobre *Mycosphaerella* aislado 2, se evidencia tratamientos con 8 extractos de cuatro plantas y los porcentajes de inhibición a las 96 horas.

Los resultados obtenidos fueron de gran avance y promisorios para futuras investigaciones sobre los antifúngicos a base de extractos vegetales, biocontroladores amigables con el medio ambiente y en especial no perjudiciales para otras especies presentes en el suelo, por otra parte productos de gran potencial para el control de plagas y enfermedades no solo de las musáceas sino también de cultivos que puedan estar en asocio, estos extractos pueden ser de gran enfoque para una investigación sobre que espectro o amplio control presentan estos extractos no solo para un hongo sino para una variedad de hongos fitopatógenos, se hace relevante avanzar más sobre las propiedades, metabolitos y enzimas puede

tener estos productos para que así se concentre estudios más amplios sobre el control de plagas y enfermedades a partir de biocontroladores a base de productos vegetales.

Los resultados obtenidos evidencian que el extracto P1, de hojas y tallo es el que presenta mejor dinámica de porcentaje de inhibición en los hongo estudiados, este extracto presentó inhibiciones superiores al 60% en la inhibición en el crecimiento del hongo, sin embargo el extracto 7 presenta una inhibición igual o superior al 50%, seguido por el extracto P2, estos extractos nos reflejaron la hipótesis que se tenía en donde se evidencia que *Piper* es un buen biocontrolador con gran potencial para el control de enfermedades en cultivos de musáceas. Estos estudios se pueden tomar como preliminares frente al control de enfermedades en musáceas, a futuro se efectuarán más investigaciones implementando mayor concentración del extracto, así se podrá evaluar el impacto en la efectividad de los extractos con relación a hongos fitopatógenos, obteniendo una relación en la cantidad de concentración aplicada y la mortalidad del hongo. Esta investigación se basó solo en la evaluación de una dosis de 1000µg/disco de concentración del extracto.

**Actividad antifúngica de extractos de *Piper*
sobre *F. oxysporum* y *M. fijiensis***



Grafica 4. Donde se representan todos los hongos sometidos al tratamiento con los 8 extractos de cuatro especies, se puede realizar una comparación más exhaustiva y precisa para todos los tratamientos sobre los porcentajes de inhibición de cada extracto.

Mediante los resultados obtenidos se evidencio diferentes efectos de los extracto frente a los tratamientos para cada enfermedad, en la Gráfica 4 se puede observar los porcentajes de inhibición presentado por cada una de las plantas del género *Piper* donde se realizó las extracciones, tanto para hojas como para tallo donde se refleja una diferencia estadísticamente significativa para cada uno de los extractos, lo que significa que los resultados de actividad antifúngica son diferentes para cada una de las plantas evaluadas, en donde existe diferencia entre la plantas utilizadas para las extracciones de las cuales se realizaron los extractos, sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa cuando se hace referencia a las extracciones de hojas y tallo de la misma especie de planta en cuanto a la actividad biológica presentada con cada uno de los hongos, esto debido a que las extracciones de hojas y tallo de la misma planta presentan los mismos metabolitos que generan igual porcentaje de inhibición con respecto al hongo. Lo que genera resultados prometedores para el estudio de las ventajas, beneficios y rentabilidad

en la implementación de extractos naturales para el manejo, control y prevención de enfermedades, causadas a la mayoría de los recursos agrícolas y en especial dar gran enfoque en los cultivos agrícolas de importancia económica. Se obtuvieron tres aislados identificados preliminarmente como *Mycosphaerella* sp. y uno de *Fusarium* sp., presentes en cultivos de musáceas del Suroeste Antioqueño, por medio de la caracterización fenotípica a nivel macroscópico y microscópico.

6 DISCUSIÓN

La actividad antifúngica que presenta una gran variedad de especies de plantas, en especial la familia *Piperaceae*, ha hecho que se enfoquen los estudios en los metabolitos y propiedades que exhibe este grupo con relación a la capacidad inhibitoria del crecimiento de hongos fitopatógenos presentes en cultivos agrícolas, en donde son los responsables de la destrucción de más del 90% en las plantaciones con importancia económica, los resultados obtenidos en este trabajo y en trabajos realizados sobre las propiedades presentes en extractos de *piperáceas*, en donde se hizo estudio sobre la actividad antifúngica de los extractos vegetales de *Piper eripodon* y *Zanthoxylum monophyllum* y sus metabolitos secundarios mayoritarios sobre dos hongos fitopatógenos de clavel (*Dianthus caryophyllus*)(Moreno Lopez, 2011), en donde se presentaron actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y *Botrytis cinerea*. En estos ensayos la mayor actividad la presentaron los extractos vegetales. En donde obtuvieron un 60% en la inhibición del crecimiento del hongo, en este trabajo los resultados obtenidos fueron superiores al 50% en la inhibición en el crecimiento del hongo *Fusarium* sp. y un resultado del 55 al 60% en la inhibición del crecimiento para el hongo *Mycosphaerella* sp., estos estudios realizados frente al uso de extractos vegetales para el control de hongos fitopatógenos son bastantes prometedores para la implementación y cambio en el manejo de problemas sanitarios con productos químicos a productos de base natural menos nocivos y más beneficiosos con el medio ambiente, el cultivo y el suelo.

En estudios realizados en la evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Mosquera et al., 2009),

se logró determinar que los extractos metanólicos más activos frente a la fase asexual del hongo fueron *Topobea cf discolor* (UTP-160, *Melastomataceae*) y *Phyllanthus* sp (UTP-52, *Euphorbiaceae*), puesto que dichos extractos no permitieron el crecimiento del hongo *Mycosphaerella* sp. obteniendo resultados de más del 50% en la inhibición, con relación a los extractos de *Piper* empleados para el control de *Mycosphaerella* sp. en este estudio se pudo determinar que los extractos codificados como P1H – P1T y P7H, fueron los extractos con mayor porcentaje de inhibición frente al crecimiento del hongo, porcentajes que alcanzaron los 60% en la inhibición de la actividad del hongo.

Cabe resaltar que los extractos codificados como P1H – P1T y P7H – P7T fueron los extractos con mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento de los hongos causantes de más del 90% en la destrucción de cultivos de musáceas, obteniendo un promedio superior al 55% en la inhibición de *Mycosphaerella* sp. y *Fusarium* sp. Estos resultados son bastante prometedores en el estudio a futuro de los mecanismos de defensa de las plantas, los metabolitos y propiedades implementadas para la protección, en donde pueden actuar por forma de extractos etanólicos en el control y prevención de enfermedades causadas por hongos en cultivos agrícolas.

7. CONCLUSIÓN

Se aislaron tres hongos en fincas ubicadas en los municipios de Andes y Jardín, Antioquia, identificados preliminarmente como *Mycosphaerella* sp. aislado 1 y aislado 2, y *Fusarium* sp., mediante análisis macroscópico y microscópico de acuerdo con características fenotípicas presentes para estos hongos.

En los ensayos realizados frente a la actividad antifúngica de extractos vegetales de dos especies del género *Piper* contra la inhibición en el crecimiento de los hongos fitopatógenos, *Mycosphaerella* sp. y *Fusarium* sp, causantes de grandes pérdidas en la producción de musáceas, se generaron resultados promisorios para el control de enfermedades producidas a cultivos agrícolas, obteniendo porcentajes del 60%, se demostró el gran potencial y las propiedades biológicas de estas especies como sustancias antifúngica. Estos reportes son los primeros generados con relación a la

actividad antifúngica de dos extractos de *Piper* en donde se obtienen resultados muy promisorios en el porcentaje de inhibición en el crecimiento sobre estos dos hongos.

8. PERSPECTIVAS

1. Genotipificar los hongos aislados para obtener una secuenciación del ADN y poder identificar el hongo presente en las musáceas hasta especie.
2. A pesar de que algunos estudios han confirmado el efecto inhibitorio de los extractos vegetales sobre hongos fitopatógenos, es raro que los compuestos bioactivos específicos sean estudiados por lo que se recomienda realizar un estudio más a fondo frente a los extractos obtenidos a partir de especies de género *Piper* en donde se tenga en cuenta el análisis de los metabolitos secundarios presentes en estos extractos, los cuales son los principales en el control de hongos fitopatógenos.
3. Centrarse en las investigaciones a nivel de campo, en donde se pueda realizar pruebas sobre la validación de estos extractos en modelos in vivo y observar el comportamiento antifúngica de los extractos formulados en campo.
4. Generar bioformulados a partir de extractos naturales que presenten actividad antifúngica.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, E., A. Pantoja, L. Gañan, and G. Ceballos. 2013. La Sigatoka negra en plátano y banano. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Andrés, M. F. 2002. Estrategias en el control y manejo de nematodos fitoparasitos. Ciencia y Medio Ambiente -CCMA-CSIC.
- Batlle Viera, A., and L. Pérez Vicente. 2009. Variabilidad genética de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense en bananos y plátanos de Cuba. Fitosanidad.
- Cardona-Piedrahita, L. F., and J. Castaño-Zapata. 2019. Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder & Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
- Cardona, C. W., S. M. Robledo, B. A. Rojano, F. Alzate, D. L. Muñoz, and C. J. Saez. 2013. Actividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel. (Piperaceae). Revista Cubana de Plantas Medicinales.
- 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. México: Acorbat, memorias XVI reunión internacional.
- Contreras, K., Y. Fernández, G. Jeancklin, and M. Jesús. 2016. Hongos Fitopatogenos. Universidad pedagógica y tecnolójic de Colombia.
- Corpoica, R. 1999. Resúmenes de tesis. Área Temática: Manejo Integrado de Plagas (MIP). Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria.
- Flores Quisbert, E. N. 2007. Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género *Piper* de la flora boliviana. Dialnet.
- ICA I.A. Ceferino González., A. de Investigación, M. S. E. A. P. – D. T. de E. y V. F. ICA, P. D. A. L. D. J. – D. T. de S. ICA, M. S. J. R. G. Á. – D. T. de I. e I. A. ICA, and M. S. M. R. R. Cruz. 2012. MANEJO FITOSANITARIO DEL CULTIVO DE PLATANO. ARTICULO- investigacion.
- Instituto Colombiano Agropecuario. 2019. Marchitez por *Fusarium* Raza 4 Tropical-Foc R4T Alerta Amarilla. Instituto colombiano Agropecuario Boletín No. 6.
- Jara, A. I. 2013. Analisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie *Piper imperiale* (Piperaceae). Tesis.
- Lema Fernández, M. A., and S. Abdo. 2016. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante In Vitro de hojas y flores de *Passiflora tripartita*. Facultad de Ciencias.
- López-Zapata, S. P., and J. Castaño-Zapata. 2019. Manejo integrado del mal de Panamá [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. sp. cubense (E.F. SM.) W.C.

Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica.

Mesa, V. A. M., P. A. Marín, O. Ocampo, J. Calle, and Z. Monsalve. 2019. Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. Revista de Investigaciones Agropecuarias.

Mesa Vanegas, A. M., J. F. Toro Suaza, F. Cardona Naranjo, and S. Blair Trujillo. 2012. Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de género Piper. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.

Morales Restrepo, N., and N. Cardona-Castro. 2018. Métodos de diagnóstico en micología. Ces Medicina.

Moreno Lopez, J. P. 2011. *ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE Piper eriopodon y Zanthoxylum monophyllum Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS SOBRE DOS HONGOS FITOPATÓGENOS DE CLAVEL (Dianthus caryophyllus)*. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia.

Mosquera, O., L. Echeverry, and J. Niño. 2009. Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Scientia et Technica.

Pino Benítez, N. 2008. Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del género Piper L. (Piperaceae). Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó.

Rahman, A., S. M. Al-Reza, and S. C. Kang. 2011. Antifungal activity of essential oil and extracts of piper chaba hunter against phytopathogenic fungi. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society.

Regnault-Roger, C., B. Philogène, and C. Vincent. 2006. Biopesticides d'origine végétale. Tropicultura.

Sepúlveda-R., L. 2015. Caracterización Fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su Relación con la Sensibilidad a Fungicidas en Colombia. Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology.

Trujillo-C., W., and R. C. Posada. 2015. Piper Andakiensis (Piperaceae) Una especie nueva de la vertiente Amazónica de la cordillera oriental de Colombia. Caldasia.

Agrios, G. N, 2005, *fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 p Urbina. C. M. 2011. Enfermedades causadas por hongos, fitopatología general, Universidad agropecuaria del trópico seco, Estelli, 2 p.*

Abreu Guirado, O.A., Rodríguez Tamargo, A.A., Morgado Montes, M., 2012. Farmacognosia, farmacobotánica, farmacogeografía y farmacoeitimología del

platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*). *Rev cubana Plant Med* 17, 181 – 193.

Bananalink (2019). *Problemas medio ambientales: monocultivos y producción de alta aportación*. <http://www.bananalink.org.uk/es/problemas-medioambientales>. (10/05/2019)

Benavente-García O., Castillo J., 2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6185 – 6205. doi:0.1021/jf8006568

Castañeda, D. (2015). Pequeños productores lideran cultivo de plátano en el suroeste antioqueño. Agencia de noticias UN. <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/pequenos-productores-lideran-cultivo-de-platano-en-suroeste-antioqueno.html>

Cisneros, F. (2015). “Control Químico”. *AgriFoodGateway*. Control de plagas Agrícolas: 9.

Corporación Colombia Internacional (CCI). 1999. Boletín CCI: SIM. Perfil de Producto Plátano No. 7, enero – marzo. <http://www.cci.org.co>. 16pp

DANE, *Enfermedades y plagas del plátano (Musa paradisiaca) y el banano (Musa acuminata; M sapientum) en Colombia*. https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/sipsa/Bol_Insumos_sep_2016.pdf [consulta 26/04/2020]

Dousseau, S., Chaves, I.D.S., De Castro, E.M., 2014. Caracterización del limbo de *Piper aduncum* L. (Piperaceae): Análisis estructurales, histoquímicos y de sus aceites esenciales. *Gayana Bot.* 71, 147 – 162. doi:10.4067/S0717-66432014000100015

Eisenback, JD, 1985. morfología detallada y la anatomía de los juveniles de segunda etapa, machos y hembras del género *Meloidogyne* (nematodos de nudo de raíz). En: Sasser, JN, Carter, CC (Eds.), *Un tratado avanzado sobre Meloidogyne. Biología y Control*, vol. 1. Estado de Carolina del Norte Univ., Raleigh. Estadísticas agrícolas de plátano: Producción, superficie y rendimiento. (2017). Recuperado de <https://blogagricultura.com/estadisticas-platano-produccion/>

GARCÍA, C.L.G.; CORREA, E.; ROJAS, N. 1995. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 23(1): 42-48.

ICA Línea agrícola (2012), *Manejo fitosanitario del cultivo de plátano (musa spp) medidas para la temporada invernal*. http://www.fao.org/fileadmin/templates/banana/documents/Docs_Resources_2015/TR4/cartilla-platano-ICA-final-BAJA.pdf. (10/05/2020)

Idárraga Piedrahita, Á., Ortiz, R.D.C., Callejas Posada, R., Merello, M. (Eds.), 2011. *Flora de Antioquia. Catálogo de las plantas vasculares. Volumen II*. Universidad de Antioquia, Missouri Botanical Garden & Oficina de planeación departamental de la gobernación de Antioquia, Medellín, Colombia.

Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. (2014). Resolución 3495 de 2014 (octubre 30). Recuperado el 5 de octubre de 2016 de http://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_ica_3495_2014.htm

Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. (29 de agosto de 2016). La mosca blanca presente en los cultivos de plátano en el Meta, comunicado ICA. Recuperado el 15 de septiembre de 2016 de <http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2016/La-mosca-blanca-presente-enlos-cultivos-de-platan.aspx>

Jaramillo, M.A., Manos, P.S., 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (*Piperaceae*). *Am. J. Bot.* 88, 706 – 716.

MARTÍNEZ, G. (1998). El cultivo del plátano en los llanos orientales. Corpoica, Regional 8, p. 44

MESA, V.A.M.; MARÍN, P. A; OCAMPO, O; CALLE, J; MONSALVE, Z. 2018. Fungicidas a partir de extractos vegetales: Una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Scielo*, 1 – 8, <http://ria.inta.gov.ar/sites/default/files/revisiones/mesa-castellano-2.pdf>.

Mueller, G; Bills, G; Foster, M. 2004. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Elsevier academic press. Londres. 777pg.

NENE, Y.L.; THAPILYAL, P.N. 2000. Fungicides in Plant Disease Control (5 ed.), Oxford and IBH Publishing Company, Nueva Delhi. 691 p.

Parada Ibañez, M. Muñoz, C. (24 de junio, 2015). “Bioinsumos de uso agrícola: potencialidades y desafíos”. *Agricultureros*.

PARDO, A.K.; ARENAS, J.J.; GÓMEZ, M.; LORA, F.M.; GÓMEZ, J.E. 2011. Determinación de la actividad antifúngica de extractos de Lantana camara frente a *Candida* spp. *Infectio*, 15(4): 235-242.

Piedrahita – Yepes, J. 2011. Colombia es el segundo importador de plátano del mundo. *Portafolio*, 29/06/2019: <https://www.portafolio.co/negocios/empresas/colombia-segundo-importador-platano-mundo-150300>

Rodríguez Saavedra A. & J.L. Rodríguez Martínez. 1999. Aspectos Socioeconómicos del Cultivo del Plátano en Colombia. Oficina Regional de Planeación - Corpoica, Regional Nueve. Manizales, abril

ROJAS, J.J.; GARCÍA, A.M.; LÓPEZ, A. 2005. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín latinoamericano del caribe de las plantas medicinales y aromáticas*, 4(2): 28-35.

Tapia, C. Amaro, J. (2014). “GÉNERO FUSARIUM”. *Scielo*.

Valencia, H. 1979. La microbiología del suelo y sus perspectivas. *Boletín informativo. Departamento de biología.* (1): 1 – 18. Universidad nacional de Colombia.

Vilela, F (2019). “El mercado de bioinsumos para el agro crece a tasa del 15% anual”. *Agricultureros*. Edición 14 de marzo.

10. ANEXOS

Ordinary one-way ANOVA	
Table Analyzed	Data 1
Data sets analyzed	A-C
ANOVA summary	
F	0.5931
P value	0.5616
P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No
R squared	0.05346
Brown-Forsythe test	
F (DFn, DFd)	0.09442 (2, 21)
P value	0.9103
P value summary	ns
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No
Bartlett's test	
Bartlett's statistic (corrected)	0.04657
P value	0.9770
P value summary	ns
Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No

Se puede observar que existe una diferencia significativa a la hora de hacer comparaciones con los tres hongos evaluados, sin embargo, al hacer un ANOVA con *Mycosphaerella fijensis* y *Fusarium spp*, no se observa alguna diferencia frente a la inhibición del crecimiento de los hongos.

RM one-way ANOVA					
Table Analyzed	Data 1				
Repeated measures ANOVA summary					
Assume sphericity?	No				
F	9.603				
P value	0.0057				
P value summary	**				
Statistically significant (P < 0.05)?	Yes				
Geisser-Greenhouse's epsilon	0.7781				
R squared	0.5784				
Was the matching effective?					
F	46.57				
P value	<0.0001				
P value summary	****				
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes				
R squared	0.9076				
ANOVA table					
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	308.6	2	154.3	F (1.556, 10.89) = 9.603	P=0.0057
Individual (between rows)	5239	7	748.4	F (7, 14) = 46.57	P<0.0001
Residual (random)	225.0	14	16.07		