



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE CEPAS
NATIVAS DE *Trichoderma* spp. FRENTE A *Mycosphaerella fijiensis* EN
PLANTAS DE BANANO A NIVEL DE INVERNADERO.”**

TESIS DE GRADO

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

“INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL”

AUTOR: VALERIA MICHELLE FLORES LEMA

TUTOR: DR. C. ROSA DEL PILAR CASTRO GÓMEZ

RIOBAMBA – ECUADOR

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. FRENTE A *Mycosphaerella fijiensis* EN PLANTAS DE BANANO A NIVEL DE INVERNADERO.**” de responsabilidad de la señorita egresada Valeria Michelle Flores Lema, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Nancy Velóz

**DECANO DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS**

Ing. Fernanda Rivera

**DIRECTORA DE ESCUELA
CIENCIAS QUÍMICAS**

Dr. C. Rosa Castro G.

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Mayra Espinoza

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Abgda. Bertha Quintanilla

**COORDINADOR
SISIB-ESPOCH**

NOTA DE TESIS ESCRITA _____

Yo, Valeria Michelle Flores Lema, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

Valeria Michelle Flores Lema

DEDICATORIA

A la Secretaria Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt) a través de la Beca otorgada a la Ingeniera Rosita Castro y al Departamento de Fitopatología por toda la ayuda y el apoyo incondicional.

Valeria

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindarme la fortaleza y no dejarme caer en los momentos más difíciles.

A mis padres Sonia y Francisco por la paciencia, dedicación y el esfuerzo puesto cada uno de mis días.

A mi esposo Daniel por ser el apoyo incondicional, brindarme siempre su amor, fortaleza y dedicación.

A mi hermana Maru por ser siempre más que una amiga, por los momentos vividos y por la ayuda brindada.

Al motivo de mi superación y lucha diaria, a mi pequeño Juan José que con su dulzura e inocencia ha hecho que todo el esfuerzo valga la pena.

A la Dr. C. Rosa Castro, mi Tutora por ser más que la mentalizadora de este proyecto, tenerme en consideración y apoyarme en la realización del mismo; principalmente por sus acertadas y oportunas observaciones.

A la Dra. Marcia Pesántez por brindarme su amistad, consejos, conocimientos, apoyo incondicional y muy valioso a lo largo de la realización de este proyecto.

A mis amigas Glenda, Margarita, Karina y Verónica por ser un gran apoyo en los momentos más difíciles de nuestra carrera.

A mis compañeras de prácticas Nancy, Mafer, Lupe por la disposición y toda la ayuda prestada.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE FIGURAS.....	v
TABLA DE CUADROS.....	vi
TABLA DE ANEXOS.....	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
CAPÍTULO I.....	1
Introducción.....	1
Situación Problemática.....	1
Formulación del Problema.....	1
<i>Problema General.....</i>	<i>1</i>
<i>Problemas Específicos.....</i>	<i>1</i>
Justificación Teórica.....	2
Justificación Práctica.....	2
Objetivos.....	3
<i>Objetivo General.....</i>	<i>3</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>3</i>
CAPÍTULO I.....	4
1. Marco Teórico.....	4
1.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación.....	4
1.2. Antecedentes de la investigación.....	5
1.3. Bases Teóricas.....	7
1.3.1. <i>El Cultivo del Banano (Musa acuminata)</i>.....	8
1.3.2. <i>Importancia del cultivo de Banano en el Ecuador</i>.....	8
1.3.3. <i>Generalidades de Trichoderma spp.</i>.....	8
1.3.4 <i>Identificación de Trichoderma spp</i>.....	9
1.3.4.1. <i>Identificación taxonómica</i>.....	10
1.3.4.2. <i>Características deseables de cepas de Trichoderma spp.</i>.....	10
1.3.4.2.1. <i>Competencia por nutrientes y espacio</i>.....	10
1.3.4.2.2. <i>Producción de antibióticos</i>.....	10

1.3.4.3.	<i>Hiperparasitismo</i>	11
1.3.4.4.	<i>Hipovirulencia</i>	12
1.3.4.5.	<i>Degradación de agrotóxicos</i>	12
1.3.4.6.	<i>Promoción del crecimiento vegetal</i>	12
1.3.5.	<i>Usos y aplicaciones</i>	13
1.3.5.1.	<i>Agente de control biológico</i>	13
1.3.6.	<i>Problemática actual de fitopatógenos en cultivo y alternativas de control</i>	14
1.3.7.	<i>Generalidades de la Sigatoka Negra (Mycosphaerella fijiensis Morelet)</i>	14
1.3.8.	<i>Identificación y clasificación de Mycosphaerella fijiensis</i>	15
1.3.9.	<i>Biología de M. fijiensis</i>	15
1.3.10.	<i>Combate químico y manejo de la resistencia a fungicidas</i>	16
1.3.11.	<i>Factores climáticos que influyen en el desarrollo de la enfermedad</i>	16
1.3.12.	<i>Diferentes estadios del desarrollo de la enfermedad</i>	18
1.3.12.1.	<i>Estadio de peca inicial</i>	18
1.3.12.2.	<i>Primer estado de raya</i>	18
1.3.12.3.	<i>Segundo estadio de raya</i>	19
1.3.12.4.	<i>Primer estado de mancha</i>	19
1.3.12.5.	<i>Segundo estado de mancha</i>	19
1.3.12.6.	<i>Tercer estado de mancha</i>	19
1.3.13.	<i>Interacción planta-patógeno</i>	19
1.3.14.	<i>Uso de marcadores de DNA en hongos fitopatógenos</i>	20
CAPÍTULO II		21
2.	Metodología	21
2.1.	Tipo y Diseño De Investigación	21
2.1.1.	<i>Por el tipo de investigación</i>	21
2.1.2.	<i>Por la temporalidad</i>	21
2.1.3.	<i>Por el tipo de enfoque</i>	21
2.1.4.	<i>Por el diseño de investigación</i>	21
2.2.	Diseño Experimental	21
2.3.	Unidad De Análisis	22
2.4.	Población De Estudio	22
2.5.	Tamaño De Muestra	22
2.6.	Selección De Muestra	23
2.6.1.	<i>Material biológico</i>	23

2.7.	Técnicas de recolección de datos	23
2.7.1.	<i>Fase de campo</i>	23
2.7.2.	<i>Fase de laboratorio</i>	23
2.7.2.1.	<i>Mecanismos</i>	24
2.7.2.1.1.	<i>Aislamiento, purificación e identificación del patógeno</i>	24
2.7.2.1.2.	<i>Aislamiento, purificación e identificación del antagonista Trichoderma sp</i>	24
2.7.2.1.3.	<i>Determinación del Ritmo de Crecimiento del antagonista</i>	25
2.7.2.1.4.	<i>Identificación molecular de Trichoderma sp</i>	25
2.8.	Extracción de ADN	25
2.9.	Cuantificación ADN	26
2.10.	Amplificación marcadores ITS1/ITS4	26
2.11.	Secuenciación	27
2.12.	Pruebas de Antagonismo	27
2.13.	Preparación de Invernadero y Aclimatación de plantas de banano (cv. ‘Williams’ (<i>Musa AAA</i>))	29
2.14.	Preparación de Inóculos	29
2.14.1.	<i>Inóculo de M. fijiensis</i>	29
2.15.	Preparación del Bioformulado	29
2.15.1.	<i>Preparación del Bioformulado Sólido</i>	29
2.15.1.1.	<i>Preparación del sustrato</i>	29
2.15.1.2.	<i>Inoculación de Trichoderma harzianum</i>	30
2.16.	Preparación del Bioformulado Líquido	30
2.17.	Cuantificación de esporas del bioformulado	31
2.18.	Inoculación a nivel de Invernadero	32
2.19.	Análisis e Interpretación de la Información	32
2.20.	Determinación del Ritmo de Crecimiento del antagonista	33
2.21.	Cuantificación de esporas del bioformulado	33
2.22.	Identificación a nivel de especie	33
2.23.	Registro de Variables a Nivel de Invernadero	33
CAPÍTULO III		35
3.	Resultados y Discusión	35
3.1.	Análisis, interpretación y discusión de resultados	35
3.1.2.	<i>Aislamiento y purificación de 1 cepa de Mycosphaerella fijiensis Morelet</i>	35
3.1.3.	<i>Aislamiento y Purificación de 10 Cepas De Trichoderma spp</i>	36

3.1.4.	<i>Ritmo De Crecimiento Radial De Trichoderma spp</i>	37
3.1.4.1.	<i>Ritmo de Crecimiento Radial de Trichoderma sp. a las 24 horas</i>	37
3.1.4.2	<i>Ritmo de Crecimiento Radial de Trichoderma sp. a las 48 horas</i>	39
3.1.5.	<i>Identificación Morfológica de 1 Cepa de Mycosphaerella fijiensis</i>	40
3.1.6.	<i>Identificación morfológica, y molecular de 10 cepas de Trichoderma sp.</i>	41
3.1.7.	<i>Identificación Molecular De Trichoderma sp</i>	47
3.1.7.1.	<i>Cuantificación de ADN</i>	47
3.1.7.2.	<i>Amplificación ITS1/ITS4</i>	48
3.1.8.	<i>Determinación Del Tipo De Antagonismo</i>	61
3.1.9.	<i>Diagrama De La Elaboración De Bioformulados Preparados A Base De Trichoderma harzianum</i>	65
3.1.9.1.	<i>Cuantificación De Esporas Del Bioformulado Líquido</i>	66
3.1.9.2.	<i>Viabilidad Del Bioformulado Líquido</i>	66
3.1.10.	<i>Actividad antagónica de las cepas de Trichoderma sp. Frente a Mycosphaerella fijiensis Morelet en plantas de banano ((cv. ‘williams’ (musa aaa)) a nivel de invernadero</i>	67
3.1.10.1	<i>Uso de variables epifitológicas</i>	67
CAPITULO IV	75
4.	Impactos	75
4.1.	Propuesta para la solución del problema	75
4.2.	Costos de implementación de la propuesta	76
4.3.	Beneficios que aporta la propuesta	77
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	84

TABLA DE FIGURAS

Figura 1-1.	Ciclo de vida del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	17
Figura 2-2.	Antagonismo Tipo C (hiperparasitario).....	29
Figura 3-2.	(a) Empacado del sustrato, (b) Esterilización, (c) Cámara de crecimiento.....	31
Figura 4-2.	Bioformulado liquido.....	32
Figura 5-3.	Aislamiento e identificación de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet.....	35
Figura 6-3.	Distribución por Especies de las Cepas de la Colección de Cultivos microbianos de la ESPOCH.....	36
Figura 7-3.	Ritmo de crecimiento radial de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp a las 24 horas.....	39
Figura 8-3.	Ritmo de crecimiento radial de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a las 24 y 48 horas en mm.....	40
Figura 9-3.	Crecimiento en medio de cultivo PDA y estructuras características de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet.....	41
Figura 10-3.	Identificación morfológica de <i>Trichoderma harzianum</i>	43
Figura 11-3.	Identificación morfológica <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	44
Figura 12-3.	Identificación morfológica <i>Trichoderma viride</i>	45
Figura 13-3.	Identificación morfológica <i>Trichoderma koningii</i>	46
Figura 14-3.	Identificación morfológica <i>Trichoderma longibranchiatum</i>	47
Figura 15-3.	A) Cultivos de hongos frescos para extracción de ADN. B) Obtención de micelio fresco mediante raspa para extracción de ADN. C) Finalización de la extracción de ADN, precipitación del ácido (pellet) con isopropanol.....	48
Figura 16-3.	Amplificación de los marcadores ITS1/ITS4. M: marcador de talla. CP: control positivo de la reacción de amplificación. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.....	49
Figura 17-3.	<i>Trichoderma harzianum</i> CCECH-Pasaje.....	52
Figura 18-3.	<i>Trichoderma koningii</i> CCECH-TJM.....	53
Figura 19-3.	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> CCECH-M11.....	54
Figura 20-3.	<i>Trichoderma viride</i> CCECH-Tung.....	55
Figura 21-3.	<i>Trichoderma harzianum</i> CCECH-M18.....	55
Figura 22-3.	<i>Trichoderma longibranchiatum</i> CCECH-Ju13.....	56

Figura 23-3.	<i>Trichoderma viride</i> CCECH-Ju27.....	57
Figura 24-3.	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> CCECH-T5.....	58
Figura 25-3.	<i>Trichoderma pseudokoningii</i> CCECH-THSL.....	58
Figura 26-3.	<i>Trichoderma harzianum</i> CCECH-Ca36-3.....	59
Figura 27-3.	Prueba de Antagonismo de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a las 120 horas frente a <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet.....	62
Figura 28-3.	Curva de crecimiento del bioformulado liquido.....	66
Figura 29-3.	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para el tratamiento 3, Plantas de banano (cv. ‘Williams’ (Musa AAA)) inoculadas con <i>M. fijiensis</i>	83
Figura 30-3.	Evolución de los síntomas para el Tratamiento 3 (Plantas de banano cv. ‘Williams’ (Musa AAA) inoculadas con <i>M. fijiensis</i>) en casa de cultivo. Estados de síntomas (0-4) de acuerdo con escala propuesta por Alvarado-Capó et al. 2003..	83
Figura 31-3.	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para el tratamiento 4, Plantas de banano inoculadas con <i>M. fijiensis</i> y a las 72h después con <i>Trichoderma</i> cepa CCECH-Pasaje.....	68
Figura 32-3.	Evolución de los síntomas para el Tratamiento 4 (Plantas de banano cv. ‘Williams’ (Musa AAA) inoculadas con <i>M. fijiensis</i> y a las 72h después con <i>Trichoderma</i> cepa CCECH-Pasaje) en casa de cultivo. Estados de síntomas (0-1)...	69
Figura 33-3.	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para el tratamiento 5, Plantas de banano (cv. ‘Williams’ (Musa AAA)) inoculadas con <i>M.fijiensis</i> y a las 72h después con Trikofun.....	70
Figura 34-3.	Evolución de los síntomas para el Tratamiento 5 (Plantas de banano cv. ‘Williams’ (Musa AAA)) inoculadas con <i>M. fijiensis</i> y a las 72h después con Trikofun) en casa de cultivo. Estados de síntomas (0-1).....	70
Figura 35-3.	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para el tratamiento 6, Plantas de banano (cv. ‘Williams’ (Musa AAA)) inoculadas con componentes de la formulación de Trikofun (sin <i>Trichoderma</i>).....	88
Figura 36-3.	Evolución de los síntomas para el Tratamiento 6 (Plantas de banano cv. ‘Williams’ (Musa AAA) inoculadas con componentes de la formulación de Trikofun (sin <i>Trichoderma</i>)) en casa de cultivo. Estados de síntomas (0-1).....	89
Figura 37-3.	Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para todos los tratamientos.....	90

TABLA DE CUADROS

Cuadro 1-2.	Esquema del diseño de los tratamientos a nivel de invernadero.....	22
Cuadro 2-2.	Mix PCR para la amplificación de los marcadores ITS1/ITS4.....	26
Cuadro 3-2.	Programa de amplificación para los marcadores ITS1/ITS4.....	27
Cuadro 4-2.	Códigos y localidades de recolección de muestras de suelo y vegetales de diferentes fincas bananeras para el aislamiento de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> sp y una de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet.....	33
Cuadro 5-3.	Análisis de Varianza para el ritmo de crecimiento radial de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. a las 24 horas.....	37
Cuadro 6-3.	Prueba de Tukey al 5% de <i>Trichoderma</i> spp. a las 24 horas.....	38
Cuadro 7-3.	Prueba de Tukey al 5% de <i>Trichoderma</i> spp. a las 24 horas.....	39
Cuadro 8-3.	Cuantificación y pureza de ADNs extraídos.....	48
Cuadro 9-3.	Identificación molecular de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> sp por Secuenciación.....	49
Cuadro 10-3.	Análisis de Varianza para el antagonismo de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet a las 120 horas.....	61
Cuadro 11-4.	Costos Tratamiento Químico.....	76
Cuadro 12-4.	Costos Tratamiento Biológico.....	76

TABLA DE ANEXOS

Anexo A	Características de los conidios de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> sp.....	85
Anexo B	Características de los conidióforos de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	88
Anexo C	Características de las fiálides de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	90
Anexo D	Características de las clamidosporas de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	92
Anexo E	Características medio de cultivo de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	94
Anexo F	Características de las ascosporas de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	96
Anexo G	Ritmo de Crecimiento Radial para <i>Trichoderma</i> en mm a las 24 y 48 horas..	98
Anexo H	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> Vs. <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a las 24 horas...	99
Anexo I	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> Vs. <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a las 48 horas...	99
Anexo J	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> Vs. <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a las 72 horas...	100
Anexo K	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> vs. <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a las 96 horas....	100
Anexo L	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> Vs. <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a las 120 horas..	101
Anexo M	Recuento de esporas en la cámara de Neubauer del bioformulado líquido almacenado a 4°C.....	101

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C:	Grados Celsius
DPI:	Días posteriores a la inoculación.
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura.
FRAC:	Food Research and Action Center
G:	Gramos
ISTH:	International Subcommission on <i>Trichoderma</i> and <i>Hypocrea</i> Taxonomy
L:	Litros
m:	Metros
mL:	Mililitro
mm:	Milímetros
PDA:	Medio de cultivo papa dextrosa agar
PDB:	Medio de cultivo caldo dextrosa agar
pH:	Potencial de hidrógeno
TDE:	Tiempo de desarrollo de la enfermedad.
TES:	Tiempo de evolución de los síntomas.
Vs:	Versus
UPC:	Unidades propagadoras de colonias

RESUMEN

Se realizó el aislamiento, purificación e identificación de 10 cepas nativas de *Trichoderma* sp y 1 cepa de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de varias zonas bananeras del país tanto convencionales como orgánicas, con viabilidad a ser utilizado como método de control alternativo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en cultivos de banano. Posteriormente se evaluó el ritmo de crecimiento radial de las 10 cepas nativas de *Trichoderma* sp., para proceder a una identificación molecular y morfológica. Se evaluó el efecto antagónico *in vitro* de *Trichoderma* Vs. *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, en donde el mejor control antagónico fue de la cepa CCECH-Pasaje (*Trichoderma harzianum*). Para determinar el efecto antagónico de *Trichoderma* sobre *M. fijiensis*, se formuló un biofungicida a base de *Trichoderma harzianum*, el cual se evaluó en condiciones controladas de invernadero, experimentando 7 tratamientos con 5 repeticiones cada uno, con plantas crecidas *in vitro* provenientes del CIBE (ESPOL), en donde, en los Tratamientos 1, 2 y 7, no se observa el apareamiento de síntomas hasta los 64 días de la evaluación del ensayo, en el Tratamiento 3, las hojas sanas permanecen hasta el día 10 días posteriores a la inoculación, y existe una evolución de síntomas hasta los estados 3 y 4, los Tratamientos 4, 5 y 6 presentan una evolución de síntomas hasta el estado 1. La cepa CCECH-Pasaje (*Trichoderma harzianum*) resultó el mejor control antagónico en cada uno de los ensayos por lo que mediante la formulación de un biofungicida a partir de esta, permite controlar agentes fitopatógenos que disminuyen la productividad de varios cultivos de interés económico para el Ecuador, además de mantener el cuidado del ambiente y la salud humana.

Palabras Clave: <*Trichoderma*> <SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella Fijiensis* Morelet) >
<BIOFUNGICIDA> <HONGOS ENTOMOPATÓGENOS> <MARCADORES DE DNA>
<CONTROL BIOLÓGICO> <CONTAMINACIÓN AMBIENTAL> <PRODUCCIÓN LIMPIA>
<CONTROL QUÍMICO> <AGRICULTURA SUSTENTABLE>

SUMMARY

It was conducted a process of isolation, purification and identification of 10 native strains of *Trichoderma* sp and 1 strain of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet from several banana zones of the country, both conventional as organic ones with feasibility to be used as alternative control of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) in banana plantations. Subsequently, the rate of radial growth of 10 native strains of *Trichoderma* sp was assessed, in order to conduct a molecular and morphological identification. It was evaluated the in vitro antagonistic effect of *Trichoderma* vs. *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, where the best antagonistic control was the one belonging to the CCECH-Pasaje strain (*Trichoderma harzianum*). In order to determine the antagonistic effect of *Trichoderma* on *M. fijiensis*; it was formulated a bio-fungicide based on *Trichoderma harzianum*; which was evaluated under controlled greenhouse conditions, by experiencing 7 treatments 1,2 and 7, the onset of symptoms is observed up to 64 days after trial evaluation, in treatment 3, the healthy leaves remain until day 10th after the inoculation, and there is an evolution of symptoms until the states 3 and 4, treatments 4,5 and 6 show an evolution of symptoms until state 1. CCECH-Pasaje strain (*Trichoderma harzianum*) was the best antagonistic control in each trial since, by means of the formulation of a fungicide based on this strain; it is possible to control the phytopathogen agents that decrease productivity of several crops of economic interest for Ecuador, in addition of maintaining the protection of the environment and human health.

Keywords: <*Trichoderma*> <BLACK SIGATOKA (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) > <BIO-FUNGICIDE> <ENTOMOPATHOGENIC FUNGI> <DNA MARKERS> <BIO-CONTROL> <POLLUTION> <CLEAN PRODUCTION> <CHEMICAL CONTROL> <SUSTAINABLE AGRICULTURE>

INTRODUCCIÓN

Situación Problemática

La Sigatoka negra es una enfermedad foliar del banano causada por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*) y constituye el principal problema fitopatológico del cultivo. El patógeno destruye rápidamente el tejido foliar, como consecuencia se reduce la fotosíntesis y se afecta el crecimiento de la planta y la producción (Martínez 2011).

En el Ecuador el cultivo de banano constituye la actividad agrícola de mayor importancia para la economía del país, exportando 4 millones 828 mil toneladas al año, generando empleo para más de un millón de familias, que representa alrededor de 2,5 millones de personas, que en porcentaje equivalen aproximadamente al 17 % de la población actual, que dependen de una u otra forma de la industria bananera (INIAP 2010).

Formulación del Problema

Problema General:

¿De qué manera cepas nativas de *Trichoderma* spp. ejercen un efecto antagónico frente a *Mycosphaerella fijiensis* en plantas de banano a nivel de invernadero?

Problemas Específicos:

1. ¿De qué manera se realiza el aislamiento y purificación de 10 cepas de *Trichoderma* sp. y 1 de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet nativas de la Región Costa del Ecuador?
2. ¿Cómo se realiza la identificación morfológica y molecular de 10 cepas de *Trichoderma* sp. y 1 de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet?
3. ¿En qué medida se evalúa la actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma* sp. frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en plantas de banano a nivel de invernadero?

Justificación Teórica

El cultivo del banano (*Musa acuminata*) es de gran importancia a nivel de pequeños productores, al constituirse en un alimento esencial para la dieta básica y generar ingresos a la canasta familiar. Se cultiva a nivel mundial en un área aproximada de 5 290 107 hectáreas, con una producción anual de 33 349 584 TM, de las cuales el 70% se concentra en los países del África, el 27% en las regiones de América Latina y el Caribe y el 3% en Asia. En América Latina, Colombia (8%), Perú (19%) y Ecuador (38%) son los mayores productores de banano (FAO 2006).

En el Ecuador se cuenta con una superficie sembrada de 180301 hectáreas de banano. Entre los principales problemas fitosanitarios que enfrenta el cultivo, se encuentran los ocasionados por hongos y nematodos. En el caso de los hongos, la Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es considerada la enfermedad foliar más limitante y destructiva a nivel mundial (Marín y Romero 1998; Guzmán 2006).

Sumado a lo anterior, la pérdida de sensibilidad de *M. fijiensis* a ciertas moléculas químicas, debido a su enorme plasticidad genética, dada por su doble tipo de reproducción vegetativa; y la urgencia de competir en el mercado nacional e internacional con productos de excelente calidad y con una menor cantidad de residuos tóxicos, crean la necesidad de encontrar métodos que permitan reducir los daños causados por esta enfermedad.

En ese sentido, el uso de controladores biológicos para el manejo alternativo de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en el cultivo del banano, podría ser una estrategia promisorio de control. El grupo meta al que está dirigido esta investigación son los productores orgánicos, pequeños agricultores de banano y aquellos quienes comparten tecnologías amigables con el ambiente, como se refleja en los sistemas orgánicos, biológicos o en transición.

Justificación Práctica

La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) es una de las principales causas de reducción en la producción bananera en el Ecuador, por lo que es necesario incrementar alternativas ecológicas y económicamente sustentables para el control de la misma mediante el uso de productos de baja toxicidad y de origen orgánico a base de *Trichoderma*, que a más de reducir la incidencia de esta enfermedad brindan rigor y resistencia a la planta.

La utilización de antagonistas para la prevención, erradicación, y control de enfermedades, a más de ser la práctica más natural y actuar de manera efectiva, contribuirá notablemente a mejorar la economía de los agricultores y coadyuvará a la conservación y rehabilitación de los suelos en beneficio de la

naturaleza y el hombre; pues *Trichoderma* es reconocido como permitido según las normas de la Agricultura Ecológica de la Unión Europea.

El Departamento de Sanidad Vegetal sección Fitopatología en su búsqueda constante de encontrar alternativas ecológicas de control de patógenos; ha venido desarrollando e implementando el Banco de cepas de organismos benéficos, lo que contribuirá notablemente a la conservación y rehabilitación de los suelos en beneficio de la naturaleza y el hombre.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el efecto de *Trichoderma sp.* bajo condiciones de invernadero en el desarrollo de síntomas y severidad de la enfermedad causada por Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plantas de banano (cv. 'Williams' (*Musa AAA*)).

Objetivos Específicos

1. Aislar y purificar 10 cepas de *Trichoderma sp.* y 1 de *Mycosphaerella fijiensis* nativos de la Región Costa del Ecuador.
2. Identificar morfológica y molecularmente 10 cepas de *Trichoderma sp.*
3. Identificar morfológica y molecularmente 1 cepa de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.
4. Evaluar la actividad antagónica de las cepas de *Trichoderma sp.* frente a *Mycosphaerella fijiensis* en plantas de banano (cv. 'Williams' (*Musa AAA*)) a nivel de invernadero.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación

La Constitución Política vigente, prevé en su preámbulo: Una nueva forma de convivencia ciudadana, en diversidad y armonía con la naturaleza, para alcanzar el buen vivir, el *sumak kawsay*.

Por lo que se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

Se persigue realizar un control biológico en busca de mejorar la calidad de la producción ya que el incremento de la población aumenta la presión sobre los recursos naturales, por lo que se ha visto la necesidad de explotar dichos recursos al máximo para satisfacer las necesidades de cada individuo. La protección del ambiente y el desarrollo sustentable van de la mano por lo que es importante ampliar investigaciones sobre la utilización de métodos de control biológico para la protección de la agricultura, ya que esta se ha visto atacada por plagas o enfermedades que reducen su producción.

El uso de bioproductos o biopesticidas hoy en día constituye una necesidad económica y ecológica, convirtiéndolos en insumos económicamente atractivos para los productores del campo, mediante la utilización de microorganismos debidamente seleccionados por su alta eficiencia representando poco o ningún riesgo para la salud humana o el medio ambiente.

Estos postulados marcan el camino filosófico – práctico integral que la sociedad humana, naturaleza y medio ambiente en el Ecuador, deben procurar para alcanzar una relación armónica sustentable; donde el beneficio sea integral para las partes, en procura de solventar una mejor calidad de vida y lograr que las necesidades sean satisfechas en consonancia con la convivencia positiva con dicho medio ambiente y naturaleza.

Este trabajo de investigación pretende poner en práctica los postulados citados del *buen vivir*, el *sumak kawsay*, aplicados a los problemas fitosanitarios que enfrenta el cultivo del banano, ocasionado por hongos y nematodos. La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) está entre las principales causas de reducción en el volumen de la producción bananera en el Ecuador, por lo que se debe implantar alternativas ecológicas para su control, propendiendo el uso de productos de baja toxicidad y

de origen orgánico a base de *Trichoderma*, que reducen la incidencia de esta enfermedad, dando rigor y resistencia a la planta.

La importancia en el control fitosanitario del banano con esta técnica, va en beneficio de la calidad del producto, recuperación de la capa vegetal de tierra, no contaminación de las aguas freáticas, mejoramiento económico de pequeños y grandes productores, y, finalmente, acceso del producto a nuevos mercados internacionales que exigen como política de calidad que dichos productos sean ecológicamente cultivados, exigiendo los datos del origen y proceso en su cultivo.

Cabe señalar que la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, en noviembre de 2002, en Santiago de Chile presentaron la *Propuesta de un sello de calidad para promover productos de la pequeña agroindustria rural en América Latina*, realizado por: María Teresa Oyarzún Macchiavello, Consultor; Florance Tartana, FAO; Hernando Riveros, IICA – PRODAC, destacando en este trabajo *tres características o atributos del valor diferenciadores: el origen campesino del producto, el respeto por el medio ambiente durante el proceso productivo y el pago equitativo y justo por los productos.*

Si bien en el Ecuador estas prácticas agrícolas de cultivo son recientes, a través del postulado del *buen vivir*, en la praxis como política de Estado, se han fijado los parámetros para participar en el mercado consumidor primero nacional y luego internacional, con esas directrices integrales de calidad, respeto del medio ambiente y mejoramiento de la calidad de vida de productores y consumidores. Esta investigación a más del objetivo general, en su desarrollo pretende sustentar el cambio ecológico necesario que los agricultores deben asumir en el control fitosanitario, en este caso, del cultivo del banano, como modelo a aplicar en la agroindustria.

1.2. Antecedentes de la investigación

El género *Trichoderma* contiene especies que son de importancia biotecnológica. Algunas de ellas son usadas como agentes de biocontrol contra enfermedades de plantas, otras se utilizan para la producción de enzimas y antibióticos, en la biorremediación de ambientes contaminados, y como fuente de genes para la obtención de plantas transgénicas.

Con relación a esto Sánchez López, V. (2006) realiza un estudio con el título de Aislamiento y caracterización de *Trichoderma spp.* de diferentes ecosistemas en la región de Papaloapan- México, siendo una investigación de campo de carácter descriptivo, el cual tenía como propósito aislar y caracterizar cepas de *Trichoderma* presentes en ecosistemas cultivados y naturales en la Cuenca del Papaloapán, y representa el primer paso para desarrollar un programa de control biológico como una estrategia alternativa para el manejo de las enfermedades que afectan a los cultivos tropicales tales

como el plátano (*Musa acuminata*), la pina (*Ananascumusus*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y el litchi (*Litchi chinensis*) en la cuenca del Papaloapán.

Es por esta razón que Sánchez Pérez, M. (2009) realizó un trabajo de grado en el Instituto Politécnico Nacional de México sobre el Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma sp.* nativo del norte de Tamaulipas, dicho documento tenía como objetivo obtener aislados de *Trichoderma sp.* nativos del norte de Tamaulipas, estimando que ellos están adaptados a las condiciones de la región, para después, determinar la especie a la cual pertenecen y evaluar su actividad como antagonista de dos fitopatógenos de importancia como son, *Macrophominaphaseolina* y *Aspergillus parasiticus*. Además, determinar la presencia de fitohormonas que sean sintetizadas por *Trichoderma sp.* a través de las cuales están asociadas a la promoción de crecimiento vegetal o aumento en la biomasa de las plantas.

Es importante mencionar que Guigón López, C. (2010) desarrolló un trabajo en México titulado Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma sp.* su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos con la finalidad de identificar una herramienta útil y confiable para conocer el potencial como agente de biocontrol de cepas de *Trichoderma* en ensayos *in vitro* para determinar antagonismos, los cuales se utilizan principalmente como herramienta predictiva para determinar la capacidad de inhibición del crecimiento, antes de efectuar estudios que requieren más tiempo y costo económico. Bajo estas premisas, seis cepas nativas de *Trichoderma sp.* fueron identificadas a nivel de especie y caracterizadas en cuanto a su tasa de crecimiento y actividad antagónica *in vitro* contra *Botrytis cinérea* *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich, *Rhizoctoniasolani* Kunh.

De los primeros trabajos que se tienen a nivel de Ecuador, provincia de Chimborazo, ESPOCH, Departamento de Sanidad Vegetal tenemos a Cazco (2005) y Aimacaña (2007), quienes aislaron e identificaron cepas de *Trichoderma* y *Mycosphaerella fijiensis* y las probaron a nivel *in vitro* con resultados satisfactorios.

1.3. Bases Teóricas

1.3.1. El Cultivo del Banano (*Musa acuminata*)

El banano (*Musa acuminata*) es un frutal oriundo del Sudeste asiático, probablemente originado en una región situada entre la India y el este de la península Malaya (Álvarez, 1981).

Es una planta perenne que se reemplaza. No crecen de una semilla, sino de un bulbo o un rizoma. El tiempo entre la siembra de una planta de banano y la cosecha del racimo es de 9 a 12 meses. La flor

aparece en el sexto o séptimo mes. Se cosechan durante todo el año no tienen una temporada de crecimiento.

Se cultivan los bananos en las regiones tropicales donde la temperatura promedio es de 27° C y la precipitación anual es entre 1981.2 y 2489.2 mm. Necesitan suelo húmedo con buen drenaje. De hecho, se cultiva la mayoría de los bananos exportados dentro de los 30° a cada lado del Ecuador.

Las plantaciones son predominantes en América Latina y requieren grandes inversiones en infraestructura y tecnología para transporte, irrigación, drenaje y facilidades de embalaje. Producción de minifundistas es menos intensa en capital y más intensa en trabajo. Este sistema está presente principalmente en el Caribe Oriental ya que no es posible utilizar el sistema de las plantaciones, debido a factores topográficos.

El cultivo del banano (*Musa acuminata*) es, por lo general, intenso en trabajo, y consiste en la eliminación de vegetación de la selva, el apuntalamiento de las plantas para contrarrestar el torcimiento por el peso de la fruta, y la irrigación en algunas regiones. Además de un intensivo uso de pesticidas, el proceso de producción convencional consiste en cubrir los racimos de plátanos con bolsas de polietileno para protegerlos del viento, de los ataques de insectos y pájaros y para mantener la temperatura óptima.

1.3.2. Importancia del cultivo de Banano en el Ecuador

La producción bananera del país, se realiza en 20 provincias del territorio continental. La Costa aporta con el 89% de la producción nacional, Sierra con el 10% y el Oriente con el 1%. Se produjo en 1998 un total nacional de 4' 226.200 toneladas métricas, Moreano (2009).

En la Costa, las de mayor producción son: la provincia de Los Ríos con el 35 % de la producción total y Guayas con el 32%.

En la Sierra, en las regiones cálidas de las provincias de Cañar el 3,8 %. Bolívar con el 1.8%, Sto. Domingo de los Tsáchilas con 1.4% y Loja con apenas el 0.8% de la producción nacional; las demás provincias tienen una producción mínima.

En el país existen cerca de 5000 productores de banano, de acuerdo al tamaño de la plantación, el 80% corresponden a propiedades menores de 30 hectáreas y tan solo el 3% a mayores de 100 has.

De las exportadoras de banano, tres empresas (Bananera Noboa, Reybanpac, UBESA.) concentran los montos de exportación más altos, alcanzando el 67% del total de las exportaciones.

Bananera Noboa ha sido la exportadora más importante y la que ha ocupado el lugar por más de 30 años.

La superficie cultivada es de 131.000 ha. De estas el 71% están tecnificadas. El promedio de rendimiento es de 32 TM/ha, la productividad más alta se encuentra en la provincia de los Ríos con 39.2 TM, y la más baja en Manabí con 20.

Uno de los problemas graves que presenta la producción del banano es el uso inadecuado de la tierra y los sistemas de cultivo.

De los mayores países productores de banano de Latinoamérica, el Ecuador muestra un rendimiento productivo menor, 37 TM/ ha. Comparadas con las 51 de Colombia y las 41 de Costa Rica.

Si se mejorara el rendimiento, miles de ha. que hoy son utilizadas para el banano podrían ser destinadas para otros cultivos.

La cantidad de empleo con que este sector aporta es de 200.000 personas en forma directa en las plantaciones y aproximadamente 400.000 más en actividades relacionadas con la producción y exportación de banano en el país.

Los lugares de destino del banano ecuatoriano son: Europa el 55%, Estados Unidos el 30%, Asia el 13% y otros 2%.

Los principales países exportadores de banano a nivel mundial son: Ecuador, Costa Rica y Colombia, juntos representan el 63 % de las exportaciones totales de la fruta.

Según previsiones realizadas por la FAO la demanda mundial de banano crecerá en un 3 %, la oferta mundial será de cerca de 13 millones de toneladas, lo que producirá una sobre oferta porque la demanda es de un poco más de 12 millones.

Razón por la cual no se avizora que los precios internacionales puedan mejorar.

1.3.3. Generalidades de *Trichoderma spp.*

Trichoderma spp. pertenece a la subdivisión Deuteromicete y es un hongo anaerobio facultativo, anamorfo y de reproducción asexual, la cual se caracteriza por la formación de conidios (Domsch *et. al.*, 1993), su estadio sexual es conocido como *Hypocrea*.

Trichoderma spp. es un hongo de vida libre en suelos y ecosistemas de raíz (Harman *et al.*, 2004) y puede estar presente en la materia orgánica de los suelos y en residuos de cultivos (Rincón, 1992; Cupull *et. al.*, 2003). Su morfología al microscopio corresponde a hifas hialinas septadas, conidióforos, fiálides y conidios. Los conidióforos son hialinos, generalmente ramificados, se forman de las hifas en un ángulo de 90° y en ocasiones llegan a tener una disposición piramidal. Las fiálides son hialinas, en forma de matraz, se adhieren a los conidióforos por la parte más amplia, pueden ser solitarias o dispuestas en racimos y producen los conidios en el extremo (Kubicek y Harman, 1998). Los conidios son unicelulares de forma redonda o elipsoidal, con 3 µm de diámetro aproximadamente, los cuales

poseen una pigmentación verdosa. Algunas especies de *Trichoderma* sp. cuando se desarrollan en medios de cultivo con condiciones restringidas (pH, humedad, fuente de carbono, nutrientes) son capaces de producir clamidosporas (Kubicek y Harman, 1998).

Las mejores condiciones de crecimiento para este hongo son:

- Temperatura: se desarrolla en un rango de 15-35°C, siendo la óptima de 25°C.
- Humedad relativa: capaz de crecer entre el 20 y 80% siendo de 70% la mejor.
- pH: de 6 a 6.5 es el adecuado para su desarrollo pero puede sobrevivir en rangos mayores, debido a la capacidad que tiene de acidificar el medio en el que se encuentra, mediante secreción de ácidos orgánicos.
- Carbono: La principal fuente de carbono que asimila es celulosa.

En medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) *Trichoderma* spp, presenta un crecimiento colonial rápido, de 5 días a 25 °C. En este medio, las colonias son de aspecto algodonoso que se compactan con el tiempo. Cuando su desarrollo es alternado con períodos de luz y oscuridad, se aprecian las zonas de crecimiento correspondiente a cada período. En ausencia de luz el micelio es de color blanco algodonoso y en presencia de luz se observa la esporulación con tonalidades verdosas, dando la apariencia de anillos en forma concéntrica (Sánchez 2009).

1.3.4. Identificación de *Trichoderma* spp.

La caracterización del género *Trichoderma* spp. se puede realizar utilizando herramientas polifásicas, con base a su actividad antifúngica, en su morfología, mediante pruebas bioquímicas y métodos moleculares, utilizadas para una correcta clasificación del género (Bissett *et. al.*, 2003; Larralde *et. al.*, 2008). Se conocen más de 100 especies de *Trichoderma* sp., ninguna conocida como patógeno en plantas, pero se sabe que *T. longibrachiatum* es un patógeno oportunista en mamíferos inmunocomprometidos (Kredics *et. al.*, 2003; Druzhinina *et. al.*, 2006). Este género posee una gran variabilidad genética, lo cual le confiere a cada especie características y propiedades diferentes. Por lo que es necesario identificar la especie con la cual se está trabajando.

1.3.4.1. Identificación taxonómica.

La identificación taxonómica estaba principalmente basada en la descripción morfológica, originando así 5 secciones del género: *Trichoderma*, *Pachybasium*, *Longibrachiatum*, *Saturnisporimy* *Hypocreanum* (Rifai, 1969; Bissett, 1991; Bissett, 1992).

1.3.4.2. Características deseables de cepas de *Trichoderma* spp.

Debido a su versatilidad, adaptación y supervivencia a diversas condiciones del suelo, el género *Trichoderma* spp. ha sido estudiado ampliamente. Entre sus propiedades más importantes están: su utilización como agente de control biológico contra fitopatógenos ya sea de forma indirecta con la absorción de nutrientes, modificación de condiciones del medio ambiente, promoción del crecimiento de la planta, producción de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios, o de forma directa con formación de estructuras especializadas ejerciendo el micoparasitismo (Papavizas *et. al.*, 1990; Rey *et. al.*, 2000; Bénitez *et. al.*, 2004; Harman *et. al.*, 2004b; Hoitink *et. al.*, 2006).

1.3.4.2.1. Competencia por nutrientes y espacio:

Trichoderma spp. es un organismo heterótrofo saprobionte, que compite con otros microorganismos, impidiendo que se desarrollen (Harman, 2006). Este hongo puede secretar moléculas llamadas sideróforos, los cuales son quelantes del hierro del medio ambiente, mineral que es necesario para la viabilidad de diversos hongos filamentosos, por lo cual, cuando *Trichoderma* spp. absorbe este mineral impide que el hongo fitopatógeno lo utilice, deteniendo así el crecimiento y desarrollo del mismo (Chet *et. al.*, 1994; Eisendle *et. al.*, 2004).

1.3.4.2.2. Producción de antibióticos

Trichoderma spp. produce antibióticos y metabolitos secundarios tóxicos para otros organismos, los cuales detienen la acción de las toxinas y otros compuestos generados por patógenos. La producción de estos compuestos es estimulada en forma directa por la presencia de un microorganismo patógeno (Kubicek y Harman, 1998; Stefanova *et. al.*, 1999; Harman *et. al.*, 2004a; Druzhinina *et. al.*, 2006).

Los metabolitos antifúngicos más conocidos que produce *Trichoderma* spp. son: gliotoxina, gliovirina, viridina aislada del medio de cultivo de *T. viride*, entre otros (Selitrennikoff, 2001), así como

metabolitos volátiles o solubles, que afectan de forma negativa el desarrollo de los patógenos, seguido esto de una fagocitosis del contenido celular (Guigón y González, 2004). Algunas de las especies de este género se caracterizan por presentar una alta producción de sustancias volátiles de naturaleza antibiociada con un pronunciado aroma a coco (Howell *et. al.*, 1993; Stefanova *et. al.*, 1999).

Algunos compuestos como la gliotoxina y viridina, además de poseer actividad antibiótica, en condiciones *in vitro* también inhiben la germinación y crecimiento radicular en mostaza (*Sinapis alba*) y otras dicotiledóneas (Bailey and Lumsden, 2004). Mientras que en monocotiledóneas sus efectos son menores (Jones *et. al.*, 1988) o cuando el pH está cerca de la neutralidad. Otros metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. son el viridiol, 9-epiviridiol y la gliovirina. El primero tiene actividad herbicida y su variante, el 9-epi-viridiol tiene efecto citotóxico en células de carcinoma epidermoide (Bailey and Lumsden, 2004; Phuwapraisisan *et. al.*, 2006).

1.3.4.3. Hiperparasitismo

El microorganismo patógeno produce estímulos que favorece el quimiotropismo de *Trichoderma* spp., haciendo que las hifas crezcan en esa dirección, hasta ponerse en contacto con el fitopatógeno, para después enrollarse o adherirse sobre las hifas. Para ello emplea estructuras especializadas llamadas apresorios y haustorios a fin de penetrar la pared celular de los hongos y degradarlos (Kubicek y Harman, 1998; Harman, 2000).

Trichoderma spp. es capaz de secretar enzimas hidrolíticas, entre las que se encuentran las quitinasas, β -glucanasas, proteasas, lipasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, fosfolipasas, RNasas y ADNasas. Esta producción es mayor cuando están presentes laminaria, la quitina o la pared celular de algún hongo fitopatógeno, o el hongo mismo. En estos casos, las enzimas secretadas por *Trichoderma* spp. degradan la pared celular del fitopatógeno, facilitando la inserción de sus estructuras especializadas y la absorción de los nutrientes del interior del fitopatógeno (De la Cruz *et. al.*, 1992; Stefanova *et. al.*, 1999; Monte, 2001; Vera *et. al.*, 2005; Harman, 2006). De las sustancias mencionadas anteriormente, las β - glucanasas y las quitinasas se consideran los metabolitos más importantes en el hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre fitopatógenos (De la Cruz *et. al.*, 1992).

1.3.4.4. Hipovirulencia

Trichoderma spp. activa el sistema de defensa de la planta al ponerse en contacto con ella, esencialmente induciendo el sistema enzimático oxidativo o activando el sistema de resistencia inducida (Howell *et. al.*, 2000; Monte, 2001; Harman *et. al.*, 2004b; Harman *et.al.*, 2004a; Hoitink *et. al.*, 2006). En estos casos se reporta la intermediación del ácido jasmónico y del etileno, los cuales conducen a la expresión de genes que codifican para unas proteínas especializadas denominadas defensinas, tioninas o proteínas antimicrobianas (AMP). Induce además la producción de otras proteínas como las PR (proteínas relacionadas con la patogénesis) no inducidas por la vía del ácido salicílico; se han reportado del grupo PR-3 en *T. reesiey* del grupo PR-4 en *T. harzianum* (Selitrnikoff, 2001). Con todo esto se forma un medio exterior inapropiado para el mantenimiento y proliferación de microorganismos patógenos (Alfano *et. al.*, 2007; Djonović *et. al.*, 2007).

1.3.4.5. Degradación de agrotóxicos

Trichoderma spp. cuenta con resistencia natural a la mayoría de los productos químicos utilizados para el control de plagas en la agricultura, incluyendo los fungicidas. Enzimas secretadas por este hongo, como la celulasa, hemicelulosa y xylanasa contribuyen a la ruptura de moléculas complejas como: hidrocarburos, clorofenoles, polisacáridos, plaguicidas y xenobióticos (Kubicek y Harman, 1998; Woo *et. al.*, 2006; Vinale *et. al.*, 2008).

La rapidez y eficacia de la acción de *Trichoderma* spp. varía dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre y los sustratos sobre el cual se desarrolle.

Sin embargo, estudios realizados por Osorio *et. al.*, en el 2005, determinaron que el estiércol y el biosólido no promueven el crecimiento del género *Trichoderma* spp.

1.3.4.6. Promoción del crecimiento vegetal

El incremento en la tasa de germinación de semilla, el aumento en el peso seco de la raíz y follaje, y el desarrollo radicular por *Trichoderma* spp. es debido a que acelera el desarrollo de los tejidos meristemáticos primarios, los cuales aumentan la germinación, el volumen, la altura, así como el peso de la planta (Moity, 1982; Cupull *et. al.*, 2003), también produce un factor de regulación de crecimiento (Salt, 1978; Windham *et. al.*, 1986) y secreta fitohormonas; aunque Yedida *et. al.* en el

2003, mencionan que no existe relación entre la estimulación de crecimiento promovida por *Trichoderma* sp. y la acumulación de fitoalexinas producidas en la interacción del hongo con la planta. El desarrollo radicular también mejora la asimilación de humedad y nutrientes por parte de la planta (Windham *et. al.*, 1986; Andreú *et. al.*, 1992; Harman, 2006; Vinale *et. al.*, 2008).

Así pues, este fenómeno de estimulación, puede deberse a un efecto directo de *Trichoderma* spp. o también a efectos secundarios, en la interacción con fitopatógenos para su control (Salt, 1978; Windham *et. al.*, 1986). La naturaleza genética y molecular del efecto de estimulación de crecimientos que otorga *Trichoderma* sp. a las plantas aún no han sido explicados (Harman *et. al.*, 2004).

Windham *et. al.*, (1986) encontraron que la especie de *T. harzianum* y *T. koningii* aumentaron el peso seco de raíz y brote 213-215% en tomate y 259-318% en tabaco, 8 semanas después de la plantación. Se tiene reportado que *T. harzianum* influye en el crecimiento vegetativo de papas (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) y que interviene en la germinación de los cafetos (González *et. al.*, 1999; Cupull *et. al.*, 2003).

1.3.5. Usos y aplicaciones.

Las propiedades del género *Trichoderma* spp, lo han convertido de mayor importancia económica para la industria, así como biofungicida comercial, también se usa en la degradación de xenobióticos y como estimulante del crecimiento vegetal (Papavizas *et. al.*, 1990; Rey *et. al.*, 2000; Howell, 2003; Harman *et. al.*, 2004b; Hoitink *et. al.*, 2006).

1.3.5.1. Agente de control biológico

La aplicación de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico se debe a las relaciones antagonistas que establece contra otros hongos fitopatógenos que viven en el suelo, además, ha mostrado influencia en la promoción del crecimiento de algunas plantas de importancia económica, ya que facilita la absorción de nutrientes. Otro efecto favorable es que induce resistencia a fitopatógenos en las plantas con las que se asocia (Windham *et. al.*, 1986; Andreú *et. al.*, 1992; González *et. al.*, 1999; Hermosa *et. al.*, 2000; Rey *et. al.*, 2000; Monte, 2001; Harman, 2006; Vera *et. al.*, 2005; Alfano *et. al.*, 2007; Vinale *et. al.*, 2008).

El antagonismo que se presenta contra fitopatógenos, se debe a diversos mecanismos, como el de competencia por nutrientes y espacio, antibiosis, hiperparasitismo e hipovirulencia, los cuales no son excluyentes entre sí, y pueden actuar de forma sinérgica. *Trichoderma* spp. es utilizado como

antagónico por su eficacia para el control de *Botrytis* spp; *Colletotrichum* spp; *Fusarium* spp.; *Macrophomina phaseolina*; *Phytophthora capsici*; *Pythium* spp; *Rhizoctonia solani*; entre otros patógenos de plantas (Monte, 2001).

1.3.6. Problemática actual de fitopatógenos en cultivo y alternativas de control

Las pérdidas causadas por fitopatógenos en cultivos no son solo económicas, también cualitativas en cuestión biológica en cuanto al tamaño, color, textura, sabor, calidad nutricional, etcétera (Ashworth *et. al.*, 1981; Agrios, 1988; Rodríguez, 2001). Estos fitopatógenos pueden ser virus, bacterias, nematodos, fitoplasma, viroides y principalmente hongos, causando severas pérdidas en la agricultura (Agrios, 1988; Rey *et al.*, 2000; Monte, 2001). Estas pérdidas dan como resultado una reducción en la producción agrícola y un aumento en el precio de los alimentos (Monte, 2001).

Trichoderma spp. posee una capacidad micoparasítica a fitopatógenos tanto de raíz, como aéreos (Sharon *et. al.*, 2001, Windham *et. al.*, 1989). Es el microorganismo más utilizado como agente de control biológico, debido a que es tolerante a la aplicación de agroquímicos, ayudando a la reducción de la aplicación de plaguicidas y fertilizantes o compuestos de origen químico, que tienen efectos altamente negativos en el medioambiente y en la salud humana (Woo *et al.*, 2006; Vinale *et al.*, 2008).

1.3.7. Generalidades de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet)

La Sigatoka negra es una enfermedad foliar del banano causada por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*) y constituye el principal problema fitopatológico del cultivo. El patógeno destruye rápidamente el tejido foliar, como consecuencia se reduce la fotosíntesis y se afecta el crecimiento de la planta y la producción (Martínez *et. al.*, 2011)

La enfermedad se ha dispersado por todo el continente americano y el Caribe. En los diferentes países han ocurrido severas epidemias, que han obligado a intensificar las medidas de combate y han puesto de manifiesto la necesidad de estrategias de manejo integrado de la enfermedad, para mitigar su impacto negativo (Guzmán 2006).

1.3.8. Identificación y clasificación de *Mycosphaerella fijiensis*

El ciclo de vida de *M. fijiensis* está caracterizado por dos estados: el estado perfecto e imperfecto (Alexopoulos y Mims, 1979). Ambos estados son importantes en la infección a su hospedero.

Estado perfecto

Clase: Ascomycetae

Subclase: Eu-ascomycetae

Orden: Pseudosphaeriales

Familia: Mycosphaerellaceae

Este estado está caracterizado por la formación de peritecios, espermagonios y ascosporas. El peritecio y espermagonio se encuentran en proporciones variables durante los estados 2 y 3.

Los espermagonios son más abundantes en la superficie adaxial de la hoja, ellos frecuentemente se desarrollan en la cámara subestomatal estoma, los espermagonios maduros contienen espermatia hialina (Meredith y Lawrence, 1969).

1.3.9. Biología de *M. fijiensis*

M. fijiensis se reproduce en forma asexual y sexual. La reproducción asexual se presenta en lesiones jóvenes de la enfermedad (estrías 2 y 3 y el primer estadio de mancha). Los conidios aparecen en conidióforos sencillos que emergen de los estomas, principalmente por la superficie abaxial de las hojas. Los conidios se dispersan por el salpique de la lluvia y se asocian con la diseminación de la enfermedad a corta distancia. La fase sexual, de mayor importancia en el desarrollo de la enfermedad, se produce en las lesiones maduras, en estructuras denominadas pseudotecios, en cuyo interior se encuentran las ascosporas, las cuales son liberadas al ambiente en períodos de alta humedad para ser dispersadas hasta largas distancias por las corrientes de aire. (Stover 1980, Pérez 2002, Marín *et al.*, 2003).

1.3.10. Combate químico y manejo de la resistencia a fungicidas

El combate químico es la principal herramienta para el manejo de la Sigatoka negra. Se realiza mediante la aplicación alterna y en mezcla de fungicidas protectores y sistémicos. Los fungicidas protectores son de acción multisitio (bajo o nulo riesgo de resistencia) y se incluyen en este grupo el mancozeb y el clorotalonil. Los sistémicos son de acción sitio-específico (moderado a alto riesgo de resistencia) e incluyen fungicidas de grupos como benzimidazoles, aminas, triazoles, estrobirulinas y anilinopirimidinas. Además, se encuentran en proceso de registro nuevos fungicidas sistémicos de dos grupos químicos nunca antes utilizados en banano: carboxamidas y guanidinas. *M. fijiensis* ha desarrollado resistencia a los benzimidazoles, triazoles y estrobirulinas, lo cual ha reducido su eficacia en campo y limitado su uso (Martínez y Guzmán 2010). El desarrollo de resistencia a los fungicidas de los grupos antes mencionados, ha incrementado el uso de aminas y anilinopirimidinas, lo cual se vislumbra como un riesgo, debido al aumento en la presión de selección que se ejerce sobre el patógeno.

Por lo anterior, el uso de los fungicidas sistémicos en banano debe ajustarse a las recomendaciones establecidas por el Comité de Acción Contra la Resistencia a Fungicidas (FRAC 2010).

1.3.11. Factores climáticos que influyen en el desarrollo de la enfermedad

La recombinación debido a la naturaleza heterotálica de este patógeno, según Orozco (1998) crea un alto potencial para que ocurran cambios genéticos dentro de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, lo que puede conducir a una rápida adaptación a las condiciones ambientales cambiantes y podría ser la razón de la elevada variabilidad patogénica detectada en el mismo.

La epidemiología de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) depende de factores bióticos y abióticos. Los patrones de temperatura y humedad (básicamente el número de horas que la superficie de la hoja permanezca humedecida) y la disponibilidad de evolución de la enfermedad (Pérez y Mauri, 1992; Pérez *et al.*, 1993 y Porras y Pérez, 1997).

Fouré, (1994) planteó la existencia de una estrecha relación entre algunos factores climáticos como la humedad relativa, temperatura, precipitación y el patógeno, los cuales condicionan la incidencia y severidad de la enfermedad.

Mourichon y Zapater, (1990) plantearon que la enfermedad presentó una dinámica estacional determinada por las variaciones de temperatura y precipitación a lo largo del año, la estructura reproductiva se desarrolla mediante inoculación cruzada, se facilita cuando hay agua libre sobre las hojas.

Con relación a las temperaturas, Pérez, (1996) estimó que las ascósporas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet germinan en un rango amplio entre 10-38 °C, considerándose óptimo 27 °C, observándose que la velocidad relativa del crecimiento de los tubos germinativos de esta se deprimen fuertemente a temperaturas menores de 20°C.

Con respecto al viento, se ha observado que la concentración de las conidiósporas en las plantaciones es alta en las capas inferiores del aire, en comparación con el follaje, mientras que las ascosporas en el aire es la misma en ambas alturas, lo cual indica su importancia en el ciclo de la enfermedad (Stover, 1984).

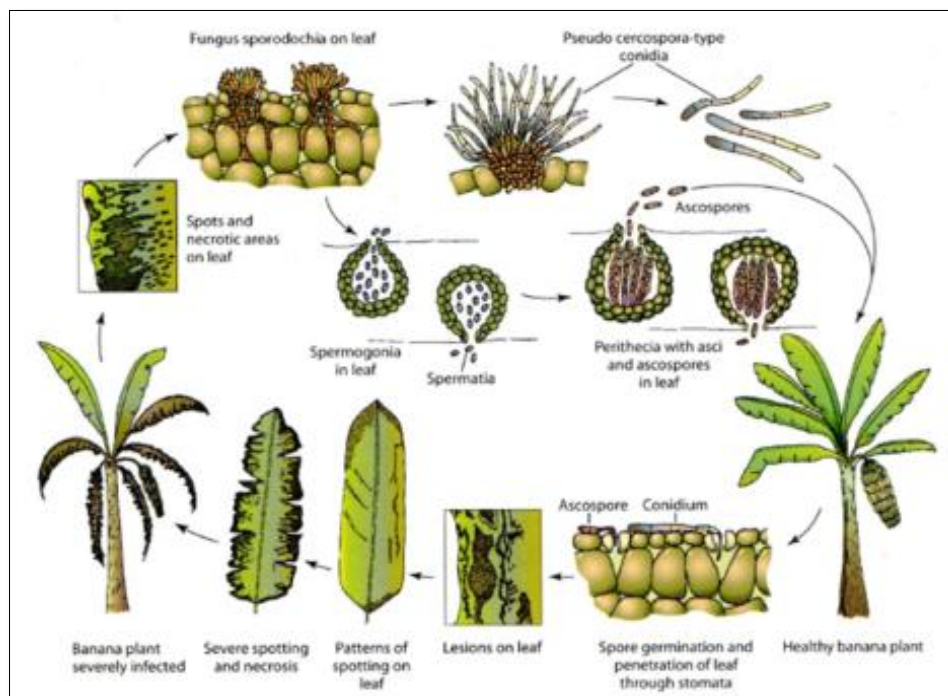


Figura 1-36: Ciclo de vida del hongo *Mycosphaerella fijiensis*
Fuente: Figura tomada de González, 1975.

Las esporas de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) son dispersadas por el viento y depositadas en las hojas más jóvenes de la planta (Douglas y Ronald, 1992). En la figura 1 se muestra como las esporas depositadas germinan, si las condiciones de humedad son buenas, emitiendo un tubo germinativo que penetra por los estomas de las hojas, para luego ramificarse y colonizar varias células vecinas, produciendo el síntoma característico de pizca y posteriormente la mancha necrosis.

La lluvia posee un papel muy importante en la liberación del inóculo, la precipitación provee condiciones de humedad que favorecen el desarrollo de las infecciones, permitiendo establecer una época relativa baja y otra de alta incidencia.

La humedad relativa es importante en proveer las condiciones hídricas de las esporas y el desarrollo de las infecciones, y el viento es el factor que permite la dispersión de las esporas del patógeno, una vez que estas han sido liberadas (Douglas y Ronald, 1992).

1.3.12. Diferentes estadios del desarrollo de la enfermedad

Se describen los siguientes estadios que se observan en las hojas:

1.3.12.1. Estadio de peca inicial:

Síntomas visibles como pequeñas pecas menores de 0.25 mm de color pardo rojizo en la superficie inferior de la hoja, no hay síntomas en la parte superior. Cuando el ataque es severo pueden observarse en la segunda hoja abierta de plantas que no han producido racimo. Usualmente aparecen en la tercera y cuarta hoja abierta.

1.3.12.2. Primer estado de raya:

La peca inicial se alarga hasta 20 mm y dos mm de ancho, paralelos a las nerviaciones de la hoja, más evidentes en la superficie inferior que en la superior y en algunos casos, son más numerosas en ambas bandas de la cara izquierda de la hoja. Estos estadios son lo más importantes para diferenciarlos de la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*). A partir del segundo estadio se produce la formación de conidios tipos cercospora (fase asexual), a diferencia de la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*), que en esta fase no produce conidios. Los conidios en estas rayas se producen sobre conidióforos aislados o agrupados durante la noche y el aire lo dispersa durante la mañana. La producción de conidióforos y conidios en estas manchas no es permanente.

1.3.12.3. Segundo estadio de raya:

La raya se alarga ligeramente, el cambio notable es el color de pardo rojizo a pardo oscuro casi negro, algunas veces con un matiz purpúreo. La raya es visible en la superficie superior de la hoja, cuando son numerosas y están más o menos uniformemente distribuidas, las hojas toman un color negruzco. En clones muy susceptibles se produce una necrosis de los tejidos en el mismo se produce una abundante formación de seudotecios y ascósporas.

1.3.12.4. Primer estado de mancha:

Las rayas se ensanchan y se hacen de contornos fusiformes, esta transición se caracteriza por un halo verde acuoso, ligeramente carmelita alrededor de las manchas. El efecto acuoso es claro en horas tempranas de la mañana cuando aún existe rocío en las hojas o después de llover.

1.3.12.5. Segundo estado de mancha

El área central de la mancha se vuelve ligeramente comprimido y el borde oscuro es más pronunciado debido al oscurecimiento. En esta fase se observan esporodoquios de menor tamaño que del patógeno.

1.3.12.6. Tercer estado de mancha:

Estado maduro; el centro de la mancha se seca y se vuelve gris y después deprimido, la mancha está rodeada de un borde estrecho, bien definido entre este y el color verde de la hoja, se observa una zona amarilla de transición.

Después que la hoja se colapsa y cuelga, las manchas quedan claramente visibles debido al centro claro y al borde oscuro.

Según Craenen, (1998) se requiere un mínimo de ocho hojas funcionales durante todo el ciclo para obtener buenos rendimientos; las plantas que presenten menos de ocho hojas sin manchas antes la floración se califican como susceptibles a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*).

1.3.13. Interacción planta-patógeno

Una gran diversidad de organismos atacan a las plantas de interés agrícola, entre ellos se encuentran: virus, micoplasmas, bacterias, hongos, nematodos, protozoarios y plantas parásitas (Baker *et al.*, 1997).

Los daños causados por los organismos fitopatógenos, ascienden a billones de dólares por efecto en la reducción de la producción en casi 20% en los principales cultivos según Oerke *et al.*, 1994; Baker *et al.*, 1997, Schwinn, 1992, mencionan que las pérdidas podrían ser más severas si variedades altamente susceptibles son cultivadas extensivamente.

Las bases genéticas de la resistencia localizada están descritas por la hipótesis de Flor (1971), la cual describe que en las interacciones gene-por-gene entre las plantas y sus patógenos, la incompatibilidad (no enfermedad) requiere genes de resistencia (R) dominantes y semidominantes de la planta y un gene correspondiente de virulencia (avr) del patógeno y mientras que en la compatibilidad sucede cuando las plantas no tienen genes R y el patógeno presenta genes de virulencia. Esta hipótesis según Keen, (1990); Crute y Pink, (1996); Scofield *et al.*, (1996); Bonas y Van de Ackerveken, (1999) la han reportado en algunas interacciones de hongos, virus, bacterias y nematodos con sus respectivos hospederos.

1.3.14. *Uso de marcadores de DNA en hongos fitopatógenos*

Los estudios sobre la biología y genética en los hongos fitopatógenos se han basado en el análisis de sus características morfológicas, bioquímicas y aloenzimas. Sin embargo, estos métodos han demostrado ser insuficientes (Weising *et al.*, 1995), en años recientes, la introducción de las técnicas de hibridación de DNA y las que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han usado para tener un diagnóstico muy preciso de las enfermedades causadas por hongos (Erlichet *et al.*, 1991; Henson y French, 1993), para la identificación y taxonomía (Cunfer y Ueng, 1999), la determinación de los modos reproductivos de hongos asexuales (Taylor *et al.*, 1999), su sistemática (Samuels y Seller, 1995; Brunset *et al.*, 1995). Sin embargo, una de las herramientas disponibles para hacer estudios sobre la genética de las poblaciones de los patógenos son los marcadores de DNA (Rosewich y McDonald, 1994; McDonald, 1997), estos son las características de uno o más loci del genoma en estudio, cuya variación es detectable por métodos analíticos (Winter y Kahl, 1995; Staubet *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1997).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Tipo y Diseño De Investigación

2.1.1. Por el tipo de investigación: Aplicada, porque se persiguió un fin directo e inmediato. Se propuso determinar el efecto antagonico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en plantas de banano (*Musa acuminata*) a nivel de invernadero para lograr su mejor aprovechamiento y tender a disminuir el uso de agroquímicos tóxicos.

2.1.2. Por la temporalidad: Longitudinal, ya que se recolectó datos a través del tiempo en puntos o periodos especificados para hacer inferencias respecto a la evolución de síntomas, severidad de la enfermedad y variación en el crecimiento de las plantas de banano (*Musa acuminata*) como consecuencia de la inoculación de *Trichoderma*.

2.1.3. Por el tipo de enfoque: Cualitativo y Cuantitativo. **Cualitativo** porque se recolectó datos sin medición numérica para describir características morfológicas de las cepas del antagonista y del patógeno. **Cuantitativo** porque se recolectó datos físicos, químicos, microbiológicos, durante el periodo febrero 2014 a abril 2014 donde se probó una hipótesis con base a una relación numérica y el análisis estadístico.

2.1.4. Por el diseño de investigación: Experimental.

2.2. Diseño Experimental

Se empleó un DCA (Diseño completo al azar) para las pruebas de laboratorio en lo referente a ritmo de crecimiento y pruebas de antagonismo.

Por trabajar en condiciones semicontroladas a nivel de invernadero se utilizó un Diseño de completo al azar (DCA) (Cuadro 1).

CUADRO 1-12: Esquema del diseño de los tratamientos a nivel de invernadero.

Tratamiento	Descripción
T1	Plantas de banano inoculadas con <i>Trichoderma</i> cepa CCECH-Pasaje.
T2	Plantas de banano inoculadas con Trikofun.
T3	Plantas de banano inoculadas con <i>M. fijiensis</i> .
T4	Plantas de banano inoculadas con <i>M. fijiensis</i> y a las 72h después con <i>Trichoderma</i> cepa CCECH-Pasaje.
T5	Plantas de banano inoculadas con <i>M. fijiensis</i> y a las 72h después con Trikofun.
T6	Plantas de banano inoculadas con componentes de la formulación de Trikofun (sin <i>Trichoderma</i>).
T7	Plantas sin inocular.

Fuente: Valeria Flores

2.3. Unidad de análisis

- Muestras de suelo.
- Muestras de hojas de banano.
- Cepas de *Trichoderma*.
- Cepa de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.
- Plantas de banano (*Musa acuminata*) (Cultivar Williams AAA).

2.4. Población de Estudio

La población correspondió a 10 muestras de suelo, 10 muestras de hojas de banano, 10 cepas de *Trichoderma*, 1 cepa de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, 80 plantas de banano (cv. ‘Williams’ (*Musa* AAA)) de las cuales se tomaron 35.

2.5. Tamaño de Muestra

- 35 Plantas de banano (cv. ‘Williams’ (*Musa* AAA)).

2.6. Selección de Muestra

2.6.1. Material biológico

El material biológico estuvo conformado por diez cepas de *Trichoderma sp.* que fueron aisladas de muestras de suelo, conjuntamente con una cepa de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) que fueron aisladas de muestras vegetales de diferentes localidades de las provincias de El Oro, Guayas, Los Ríos, Esmeraldas.

2.7. Técnicas de Recolección de Datos

2.7.1. Fase de campo

Se efectuó la recolección de hojas de banano infectadas con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, de diferentes localidades de la provincia de El Oro, Guayas, Los Ríos, Esmeraldas, se colocaron en fundas de papel, debidamente etiquetadas y fueron trasladadas al laboratorio de Fitopatología para su posterior aislamiento de acuerdo a la metodología propuesta por Aimacaña, Castro, Pesántez, 2005.

Se recolectaron además las 10 muestras de suelo, las que fueron colocadas en fundas plásticas, debidamente etiquetadas, que luego fueron trasladadas al laboratorio y con ellas se procedieron al aislamiento de *Trichoderma sp.*

2.7.2. Fase de laboratorio

- Aislamiento, purificación e identificación del patógeno.
- Aislamiento, purificación y aislamiento del antagonista.
- Determinación del ritmo de crecimiento radial del antagonista.
- Identificación por biología molecular de *Trichoderma sp.*
- Elaboración del bioformulado preparado a base de *Trichoderma sp.*
- Cuantificación de esporas del bioformulado líquido.
- Preparación de inóculos de *Mycosphaerella fijiensis*.
- Preparación de inóculos de *Trichoderma sp.*

2.7.2.1. *Mecanismos*

2.7.2.1.1. *Aislamiento, purificación e identificación del patógeno*

- Se seleccionaron partes del vegetal afectado según la metodología propuesta por Alvarado, *et. al.*, 2003.
- En la cámara de aislamiento se cortaron porciones de 7x5 cm las mismas que fueron sujetadas a papel filtro mediante grapas y fueron depositadas sobre la tapa de un recipiente plástico, se prepararon portaobjetos con Agar-agua al 3% el mismo que se dejó solidificar y fue colocado sobre soportes de vidrio que estuvieron dispuestos al interior de recipientes plásticos que contenían agua, el recipiente así dispuesto fue cerrado con la tapa plástica que contenía la sección de tejido ya descrito. Estos recipientes se los llevó a la estufa a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por un período de 24 horas para conseguir la descarga de esporas.
- Transcurrido el tiempo indicado se procedió a revisar la placa portaobjetos al microscopio hasta visualizar las estructuras características de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, las mismas que con la ayuda de una aguja fina fueron capturadas y depositadas en cajas petri que contenían medio de cultivo PDA, estas cajas fueron llevadas a la estufa de crecimiento a una temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta el apareamiento de las colonias características.

2.7.2.1.2. *Aislamiento, purificación e identificación del antagonista Trichoderma sp.*

- Una porción de suelo de cada muestra se secó a temperatura ambiente, y se tamizó.
- Se pesó 10 g de suelo y se los colocó en un erlenmeyer con 90 ml de agua destilada estéril.
- Se procedió a agitar esta suspensión terrosa por 20 minutos y luego se la dejó reposar por 5 minutos.
- Utilizando la cámara de aislamiento previamente desinfectada, se prepararon las cajas petri “madres”, colocando 1 ml de la suspensión terrosa y sobre ésta 12 mL de medio selectivo para *Trichoderma sp.*; repartiendo de modo uniforme la gota de suspensión con movimientos circulares de la caja petri.
- Una vez solidificado el medio de cultivo se procedió a picar el mismo con la ayuda de un sacabocados de 4 mm de diámetro, obteniendo de ésta manera alrededor de 90-100 círculos por caja petri “madre”.
- Alrededor de 30 círculos fueron transferidos en 3 cajas petri “hijas” las que contenían el mismo medio selectivo.

- Las cajas petri “hijas” fueron incubados en la estufa, a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ y bajo oscuridad, por cinco días. Luego de este período se las dejaron a la luz por dos días.
- Al séptimo día se constató las colonias de *Trichoderma sp.*, presente sobre los círculos.
- Se procedió a la identificación de *Trichoderma sp.*, mediante la utilización del microscopio y haciendo uso de las claves correspondientes.
- Una vez identificado al antagonista se procedió a reactivarlo en cajas petri con medio PDA, para efectuar posteriormente las pruebas de Ritmo de Crecimiento y de Antagonismo correspondientes, según la metodología propuesta por Castro, Pesántez, 2005.

2.7.2.1.3. Determinación del Ritmo de Crecimiento del antagonista

- De las diez cepas de *Trichoderma sp.*, se retiraron discos de 4 mm de diámetro de micelio joven con la ayuda de un sacabocados, para inocularlo al centro de cada una de las cajas con aproximadamente 15 ml de PDA.
- Se registraron los datos correspondientes al ritmo de crecimiento radial de las colonias en esquemas elaborados, cuyos valores son expresados en mm. Los datos fueron tomados en intervalos de 24 horas durante 120 horas de 4 radios marcados en cruz de cada colonia.
- Cada prueba estuvo constituida por tres repeticiones.

2.7.2.1.4. Identificación molecular de *Trichoderma sp.*

Se prepararon cajas Petri con cultivo puro de cada una de las diez cepas seleccionadas para el ensayo, las mismas que fueron enviadas al INIAP estación Santa Catalina para la Secuenciación de ADN de muestras fúngicas empleando los marcadores ITS1/ITS4.

2.8. Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de las muestras fúngicas siguiendo el protocolo descrito por Plaza *et al.*, (2004), con modificaciones. Para el aislamiento del ADN se recolectaron de 200 a 400 mg de micelio fresco del hongo en microtubos de 2 mL, la muestra se resuspendió en 500 μL de buffer de extracción (0,1 M NaCl, 0,5 M Tris- HCl pH 8.0, 5% de SDS) y se maceró con ayuda de arena de cuarzo por 10 minutos, se centrifugó a 13.000 rpm y se recuperó sobrenadante. Al pellet formado, se le adicionó nuevamente 500 μL de buffer de extracción y el proceso de maceración y centrifugación se repitió. Al sobrenadante recuperado se le agregó igual volumen de fenol: cloroformo: alcohol

isoamílico (25:24:1), se agitó en vótex vigorosamente; se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos y cuidadosamente se tomó la fase acuosa en un nuevo tubo. Se agregó igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó por 5 min a 13.000 rpm. Se colocó la fase acuosa en un nuevo tubo, para la precipitación del ADN se añadió 600 µL de isopropanol (-20°C), se mezcló por inmersión y se almacenó en hielo por una hora. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 10 min. El pellet de ADN se lavó dos veces con etanol al 70% y se secó a 37°C por 20 min para finalmente ser resuspendido en 50 µL de buffer TE (0.1M, pH8).

2.9. Cuantificación ADN:

Para determinar la concentración de ADN se utilizó el espectrofotómetro Epoch®, empleando el software Gen5 2.

2.10. Amplificación marcadores ITS1/ITS4

Para la amplificación se empleó el Mix detallado en Cuadro 2., y el programa de amplificación descrito en el Cuadro 3.

Cuadro 2-12: Mix PCR para la amplificación de los marcadores ITS1/ITS4.

Componentes	ConcentraciónInicial	Concentración final	Volumen para unareacción
AGUA			14,5 uL
BUFFER	5X	0,5 x	2,5 uL
MgCL2	25mM	1,5 mM	1,5 uL
dNTPs	2,5mM	0,1 mM	1 uL
PRIMER ITS1	5uM	0,4 uM	2 uL
PRIMER ITS4	5uM	0,4 uM	2 uL
TAQ POLIMERASA	5U/uL	0,1 U/uL	0,5 uL
AND	20 ng/uL	0,8 ng/uL	1 uL

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013)

Cuadro 3-12: Programa de amplificación para los marcadores ITS1/ITS4.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95 °C	5 min
35 ciclos	94°C	1 min
	55°C	2 min
	72 °C	1 min
1 ciclo	72 °C	10 min
1 ciclo	4°C	∞

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013)

2.11. Secuenciación:

Para el proceso de secuenciación fue necesario realizar réplicas de la amplificación, se realizó 4 repeticiones por cada muestra, con el objeto de contar con suficiente concentración del amplicón, considerando que este fue purificado. Para este procedimiento se empleó el kit de purificación de producto PCR PureLink® PCR Purification Kit - Life Technologies(no. catK3100-01) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Con el producto PCR purificado se realizó la reacción de secuencia con el Kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit, siguiendo las especificaciones del fabricante para un volumen de 10 uL de reacción y para la purificación el método de precipitación con EDTA/Etanol.

La secuenciación de las muestras se realizó en el ABI PRISM 310 y fueron analizadas con el software Sequencing Analysis 5.3.1

2.12. Pruebas de Antagonismo

- Las diez cepas seleccionadas de *Trichoderma sp.* y 1 cepa del patógeno *Mycosphaerella fijiensis* fueron resembradas en cajas petri con aproximadamente 15 ml de medio PDA con ayuda de un sacabocados, se extrajo de la periferia de la caja un disco de 4 mm de diámetro con micelio joven, luego se inoculó en forma opuesta el antagonista y el patógeno en los extremos de las cajas petri que contenían el mismo medio de cultivo.
- Se registraron los datos del crecimiento radial de cada una de las diez cepas de *Trichoderma sp.* y del patógeno *Mycosphaerella fijiensis*. Las mediciones se realizaron en mm cada 24 horas, hasta las 120 horas de incubación a 27 ± 1 °C.

- Se identificó visualmente la reacción antagonista - patógeno que se presentó a los cinco días de incubación; y se determinó la forma de antagonismo de acuerdo a los siguientes casos:

- A. Las hifas de los dos hongos forman un relieve en la zona de contacto (antagonismo físico).
- B. Las hifas dan origen al fenómeno de lisis en la zona de contacto (antagonismo químico).
- C. Las hifas del antagonista recubren las del parásito entrecruzándose o entrelazándose con estos y ocupando el espacio vital (antagonismo Hiperparasitario) (Figura 2).
- D. Las hifas de los dos hongos no alcanzan a tomar contacto, dando origen a un espacio vacío (antagonismo físico-químico).
- E. Las hifas de los dos hongos dan origen a comportamientos variables (no antagonista variable).

Al interior de estos agrupamientos se evaluaron la intensidad antagónica de acuerdo al crecimiento que el patógeno registró a causa de la acción contraria producida por el antagonista con aquella que tiene normalmente.

Las escalas utilizadas para la evaluación fueron:

- ++ Intensidad de antagonismo elevado (el patógeno es inhibido en el desarrollo más del 25%).
- + Intensidad de antagonismo intermedio (el patógeno es inhibido en el desarrollo menos del 25%).
- Intensidad de antagonismo nulo (el patógeno no es inhibido en el desarrollo).

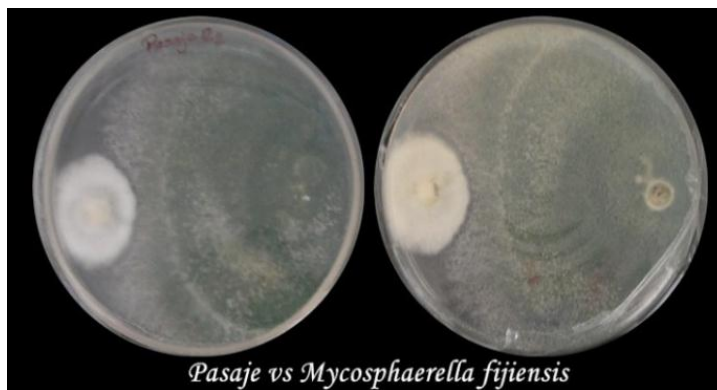


Figura 2-37: Antagonismo Tipo C (hiperparasitario)

Fuente: Valeria Flores

2.13. Preparación de Invernadero y Aclimatación de plantas de banano (cv. ‘Williams’ (*Musa* AAA)).

- Se construyó en la Facultad de Recursos Naturales un Invernadero con las siguientes dimensiones 4.85 X 5.80.
- Las plantas de banano fueron traídas del CIBE (ESPOL) correspondiente a cv. ‘Williams’ (*Musa* AAA) propagadas *in vitro* cuando tenían 12 cm de altura y 2 hojas viables, las mismas que fueron trasplantadas a recipientes que contenían sustrato consistente en una mezcla de compost, humus, tierra negra, cascarilla de arroz y depositadas al interior del invernadero 15 días antes del ensayo.

2.14. Preparación de Inóculos

2.14.1. Inóculo de *M. fijiensis*

Se preparó una suspensión de micelio de *M. fijiensis* de aproximadamente 5×10^5 fragmentos de micelio/ml según lo descrito por Leiva-Mora et al. (2010). Para calcular el volumen final se tuvo en cuenta que cada hoja lleva aproximadamente 1mL de inóculo.

Se puso el cultivo en el agitador magnético a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 días a 120 rpm, velocidad que permite disgregar el micelio en pequeños fragmentos, se contó en cámara de Newbauer y se ajustó la concentración. De esta suspensión se inoculó cajas Petri con PDA o Agar Harina de Banano y otros Erlenmeyers con PDB (Caldo dextrosa agar) para mantener el inóculo.

2.15. Preparación del Bioformulado

2.15.1. Preparación del Bioformulado Sólido

2.15.1.1. Preparación del sustrato

Una vez que la cascarilla de arroz fue liberada de impurezas, se le sometió a remojo por 24 horas en una solución acuosa de melaza al 1%, transcurrido este tiempo se desechó el excedente de agua.



(a)



(b)



(c)

Figura 3-37:(a) Empacado del sustrato, (b) Esterilización, (c) Cámara de crecimiento.

Fuente: Valeria Flores

Se mezcló la cascarilla con arrocillo lavado, el sustrato así preparado se colocó en frascos de vidrio sellados con papel Kraft al cual se lo aseguró con ligas y se esterilizó en el Autoclave a 121°C y a una atmósfera de presión por el lapso de una hora (Figura 3).

3.5.1.2. Inoculación de *Trichoderma harzianum*.

Una vez que el sustrato estuvo estéril se procedió a una homogenización del mismo, mediante agitación para evitar la formación de grumos y/o apelotonamientos.

A continuación se inoculó 1 cm² del cultivo puro de *Trichoderma harzianum* multiplicado en PDA, se distribuyó homogéneamente y se selló el frasco con papel kraft. Se colocó los frascos en la cámara de incubación por 8 días a 27± 1°C, Castro, Pesántez, (2005).

Una vez que el hongo desarrolló biomasa conidial óptima sobre toda la superficie del sustrato, se procedió a cosechar el material, el cual fue empacado en fundas plásticas transparentes, conteniendo un peso neto de 1 Kg de producto, fue almacenado en refrigeración a 4°C. con una población viable final de 2.5X10¹⁰ UPC/g de producto, Castro, Pesántez, (2005).

2.16. Preparación del Bioformulado Líquido

Para la obtención del bioformulado líquido de *Trichoderma*, se preparó una suspensión de elementos nutritivos a base de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, cobre, magnesio, manganeso, hierro, oligosacáridos y fitohormonas, que favorecen la multiplicación, una rápida esporulación y sobrevivencia del antagonista. Seguidamente se procedió a partir del producto crecido en cascarilla de

arroz + arrocillo a inocular el microorganismo en el caldo nutritivo. El producto así formulado fue empacado en botellas plásticas de 1 litro (Figura 4). Con una población final viable de 2.5×10^9 UPC/mL de producto, Castro, Pesántez, (2005).



Figura 4-37. Bioformulado líquido
Fuente: Valeria Flores

2.17. Cuantificación de esporas del bioformulado

Para la determinación del número de esporas por ml de producto se prepararon diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) del bioformulado líquido con el fin de facilitar el conteo en la cámara de Neubauer.

Para obtención de la primera dilución (10^{-1}), se transfirió con una pipeta estéril 1 ml del bioformulado a un tubo de ensayo con 9 ml de agua estéril, y se la agitó fuertemente durante 1 min.

Cada tres días se realizó el conteo de las esporas del formulado, hasta los 30 días. Posteriormente se realizó el conteo a los 45 y 60 días.

La concentración de esporas por ml de producto se calculó multiplicando la suma del número de esporas contadas en los cinco cuadrados secundarios, por el inverso de la dilución empleada y por el factor de la cámara, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Número de esporas/mL} = \text{Suma de 5 C.S.} \times \text{factor de dilución} \times 50.000.$$

Para el recuento de esporas, se utilizó la cámara de Neubauer. Se tomó el tubo de la dilución de la muestra a analizar y se la agitó durante 30 segundos. Inmediatamente después se tomó la muestra de 10ul (0.01 ml) con una pipeta automática para ser depositado en la cámara. Se dejó reposar medio

minuto antes de proceder al conteo. Luego se llevó la cámara al microscopio y se procedió a realizar el conteo respectivo con el objetivo de 40X.

2.18. Inoculación a nivel de Invernadero

A nivel de invernadero se realizó la inoculación de *M. fijiensis* Morelet se lo hizo con un pincel (de cerdas suaves para no provocar daños en el tejido) por el envés de las hojas hasta cubrirlas completamente. Se agitó el inoculo en el frasco antes de humedecer el pincel para garantizar una distribución homogénea. Se siguió indicaciones del protocolo descrito por Leiva-Mora *et al.* (2010).

La inoculación con *Trichoderma* se realizó en dosis de 2L/ha similar a lo que se hace en campo y se hizo a las 72h después de inocular *M. fijiensis* Morelet.

Número de plantas por tratamiento: 5.

Las evaluaciones se realizaron diariamente hasta la aparición de los primeros síntomas para determinar tiempo de incubación y cada 10 días después de inocular *M. fijiensis*, hasta los 64 días después de inoculados todos los tratamientos.

El registro de datos de temperatura y humedad se realizó diariamente a las 8, 12 y 16 horas.

Los datos de crecimiento de las plantas se registraron 10 días después de inoculados los diferentes tratamientos.

2.19. Análisis e Interpretación de la Información

Para la recolección de muestras se realizó el recorrido descrito en el cuadro 4.

CUADRO 4-12: Códigos y localidades de recolección de muestras de suelo y vegetales de diferentes fincas bananeras para el aislamiento de 10 cepas de *Trichoderma* sp y una de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

Código	Localidad	Sector	Manejo	Variedad	Provincia
CCECH-Pasaje	Hcda. Pio IV	Pasaje - Buena Vista	Orgánico	Williams	El Oro
CCECH-TJM	Hcda. Grupo Marún	Carretera a Jújan	Orgánico	Williams	Los Ríos
CCECH-M11	Hcda. Lilita	Pasaje	Convencional	Filipino	El Oro
CCECH-Tung	Hcda. Kimberly	La Unión	Convencional	Cavendish	El Oro
CCECH-M18	La Izquierda	Buena Vista	Orgánico	Cavendish	El Oro
CCECH-Ju 13	Carretera	Puerto Inca	Convencional	Cavendish	El Oro
CCECH-Ju 27	Hcda. Los Ángeles	Pasaje - Buena Vista	Orgánico	Williams	El Oro
CCECH-T5	Agrícola El Rosario	Guabo - 5 de Junio	Convencional	Cavendish	El Oro
CCECH-THSL	San Lorenzo	San Lorenzo	Convencional	Cavendish	Esmeraldas
CCECH-Ca36-3	Hcda. Agrícola del Pacífico	Marcelino Maridueña	Transición	Williams	Guayas

Fuente: Valeria Flores

2.20. Determinación del Ritmo de Crecimiento del antagonista

- Se registraron los datos correspondientes al ritmo de crecimiento radial de las colonias en esquemas elaborados, cuyos valores son expresados en mm. Los datos fueron tomados en intervalos de 24 horas durante 120 horas de 4 radios marcados en cruz de cada colonia.
- Cada prueba estuvo constituida por tres repeticiones.

2.21. Cuantificación de esporas del bioformulado

Cada tres días se realizó el conteo de las esporas del formulado líquido, hasta los 30 días. Posteriormente se realizó el conteo a los 45 y 60 días.

La concentración de esporas por ml de producto se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de esporas/mL} = \text{Suma de 5 C.S.} \times \text{factor de dilución} \times 50.000$$

2.22. Identificación a nivel de especie.

Las secuencias que se obtuvieron de la caracterización molecular fueron comparadas con las secuencias de referencia depositadas en la base de datos en *TrichOkey* de ISTH principalmente y en GenBank del NCBI, para determinar a que especie de *Trichoderma* pertenece cada una de las cepas.

2.23. Registro de Variables a Nivel de Invernadero.

Las evaluaciones se realizaron diariamente hasta la aparición de los primeros síntomas para determinar tiempo de incubación del patógeno y cada 10 días después de inocular *M. fijiensis*, hasta los 64 días después de inoculados todos los tratamientos.

El registro de datos de temperatura y humedad se realizó diariamente a las 8, 12 y 16 horas.

Los datos de crecimiento de las plantas se registraron 10 días después de inoculados los diferentes tratamientos.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Análisis, interpretación y discusión de resultados

4.1.2. Aislamiento y purificación de 1 cepa de *Mycosphaerella fijiensis* morelet.

De las muestras de material enfermo de cultivo de banano procedentes de las zonas en estudio se aisló e identificó el género de hongo causante de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el cultivo de banano (cv. 'Williams' (*Musa* AAA)) (Figura 5).

Figura 5-37: Aislamiento e identificación de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet



Fuente: Valeria Flores

3.1.3. Aislamiento y Purificación de 10 Cepas De *Trichoderma* spp.

Al proceder con la identificación de *Trichoderma* sp. se determinó que 3 de las 10 cepas nativas procedentes de diversas localidades de la provincia de El Oro y Guayas pertenecían a *Trichoderma harzianum*, 3 cepas procedentes de diversas localidades de la provincia de El Oro y Esmeraldas pertenecían a *Trichoderma pseudokoningii*, 2 cepas procedentes de la provincia de El Oro pertenecían a *Trichoderma viride*, 1 cepa procedente de la provincia de Los Ríos pertenecía a *Trichoderma koningii*, 1 cepa procedente de la provincia de El Oro pertenecía a *Trichoderma longibranchiatum* (Figura 6).

Al respecto Harman (1990) citado por Agamez (2008), manifiesta que los hongos del género *Trichoderma* sp., son un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en un número importante de suelos agrícolas, con abundante materia orgánica en descomposición y altas densidades de raíces.

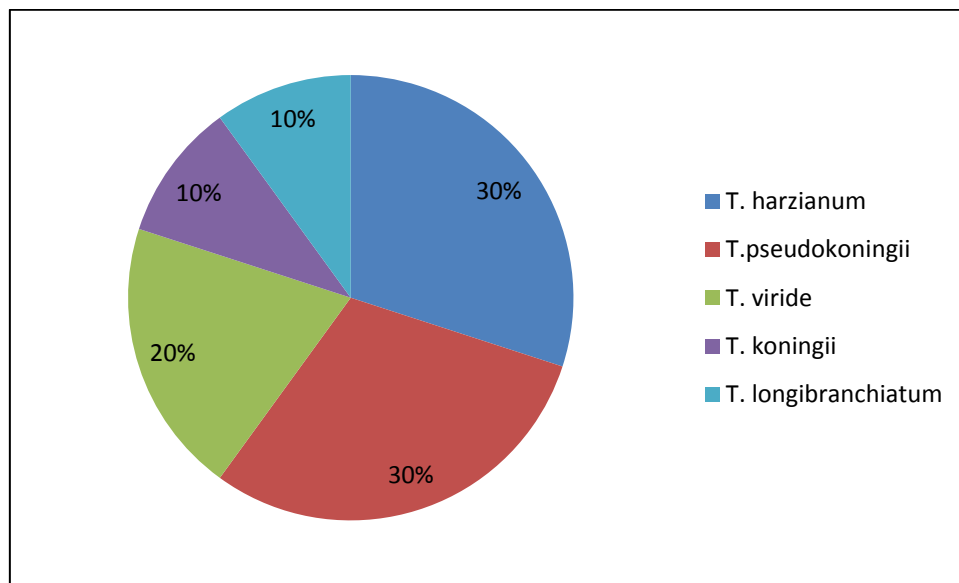


Figura 6-37: Distribución por Especies de las Cepas de la Colección de Cultivos microbianos de la ESPOCH.

Fuente: Valeria Flores

3.1.4. Ritmo De Crecimiento Radial De *Trichoderma* spp.

3.1.4.1. Ritmo de Crecimiento Radial de *Trichoderma* sp. a las 24 horas

El análisis de varianza para el ritmo de crecimiento radial de 10 cepas de *Trichoderma* a las 24 horas de incubación, presentó diferencias altamente significativas al 5% para los tratamientos, con un coeficiente de variación del 7.22 % (Cuadro 5).

Cuadro 5-12: Análisis de Varianza para el ritmo de crecimiento radial de 10 cepas de *Trichoderma* spp. a las 24 horas.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado
Tratamiento	9	347.958	38.662	17.878**
Error	20	43.251	2.163	
Total	29			

Fuente: Valeria Flores

En la Prueba de Tukey al 5% de nivel de significancia las 10 cepas tuvieron crecimientos que oscilaron entre 14,42 mm y 24,92 mm y correspondieron a los géneros *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T.pseudokoningii* y *Trichoderma longibranchiatum*, se presentaron 6 rangos ubicándose en el rango 6 el nivel D la cepa CCECH-Ca36-3 y la cepa CCECH-T. Pasaje con un crecimiento radial de 14.42 y 14.75 mm respectivamente presentando el menor crecimiento mientras que la cepa CCECH-THSL se ubica en el nivel A con un crecimiento de 24.92 mm siendo la cepa que presenta mayor velocidad de crecimiento (Cuadro 6).

Cuadro 6-12: Prueba de Tukey al 5% de *Trichoderma* spp. a las 24 horas.

Código	Horas
	24 **
CCECH-THSL	24.92 A
CCECH-Tung	23.22 AB
CCECH-TJM	23.17 AB
CCECH-M11	22.50 ABC
CCECH-T5	21.83 ABC
CCECH-Ju27	21.00 ABC
CCECH-Ju13	19.50 BC
CCECH-M18	18.25 CD
CCECH-Pasaje	14.75 D
CCECH-Ca36-3	14.42 D
Media (mm)	20.36
C.V. (%)	7.22

Fuente: Valeria Flores

Estos resultados son muy alentadores, pues Wells *et al.* (1972), realizó una descripción de una cepa de *Trichoderma harzianum*, indicando que se desarrollaba rápidamente, cubriendo el medio de cultivo, contenido en placas de petri de 100 mm, en 4 días.

Estas cepas de *Trichoderma* nativas, también presentan un crecimiento rápido, de 2 días cubriendo en su totalidad la superficie de la caja petri con PDA. El tipo de especie de la cual se trate también tiene que ver con la velocidad de crecimiento ya que según análisis estadísticos realizados a las 24 h de incubación, se observó que la cepa Ca36-3 de *T. harzianum* es la más lenta en crecimiento. La cepa CCECH-THSL de *T. pseudokoningii* muestra la mayor velocidad de crecimiento (Figura 7). El resto de las cepas pertenecientes a esta especie tienen un crecimiento intermedio. Lo cual coincide con las características en las que se basaban para la clasificación taxonómica de este género, donde consideraban además de la morfología, el tipo y tasa de crecimiento radial (Windham *et al.*, 1986; Samuels, 2004).

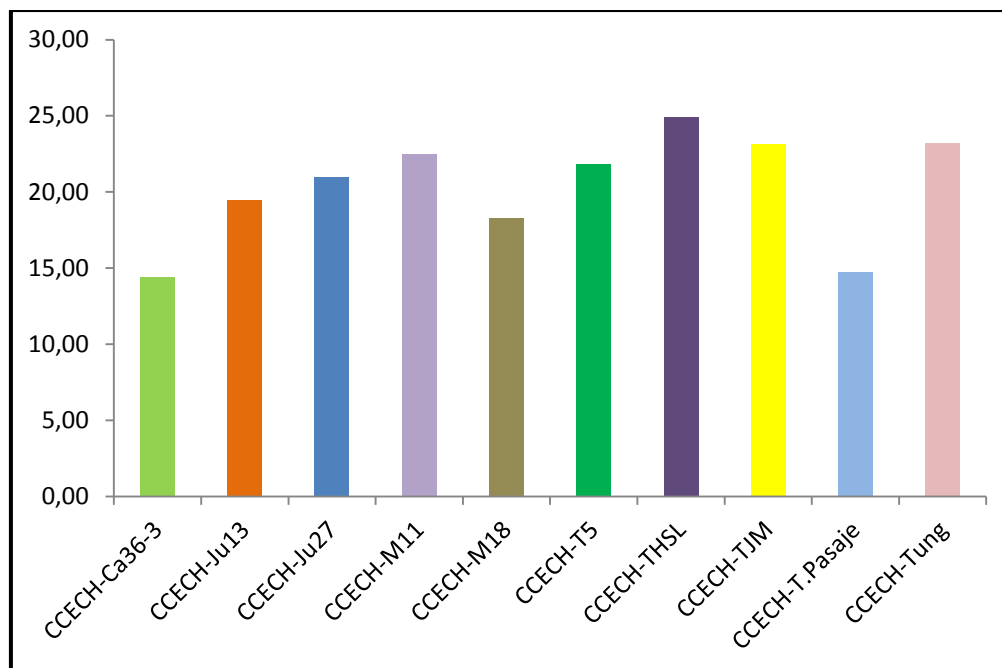


Figura 7-37: Ritmo de crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* spp. a las 24 horas.

Fuente: Valeria Flores

3.1.4.2. Ritmo de Crecimiento Radial de *Trichoderma* sp. a las 48 horas

El análisis de varianza para el ritmo de crecimiento radial de las 10 cepas de *Trichoderma* spp. a las 48 horas de incubación, no presenta diferencias significativas al 5% para los tratamientos, con un coeficiente de variación del 0.79%, como se señala en el Cuadro 7.

Cuadro 7-12: Prueba de Tukey al 5% de *Trichoderma* spp. a las 24 horas.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado
Tratamiento	9	1.575	0.175	1.400ns
Error	20	2.500	0.125	
Total	29			

Fuente: Valeria Flores

Las cepas codificadas como CCECH-Pasaje, CCECH-TJM, CCECH-M11, CCECH-Tung, CCECH-M18, CCECH-Ju13, CCECH-Ju27, CCECH-T5, CCECH-THSL y CCECH-Ca36-3 fueron las que completaron su crecimiento radial a 45 mm, por lo que fueron seleccionadas para la siguiente fase que fue la prueba de antagonismo y posteriormente caracterización morfológica y molecular (Figura 8).

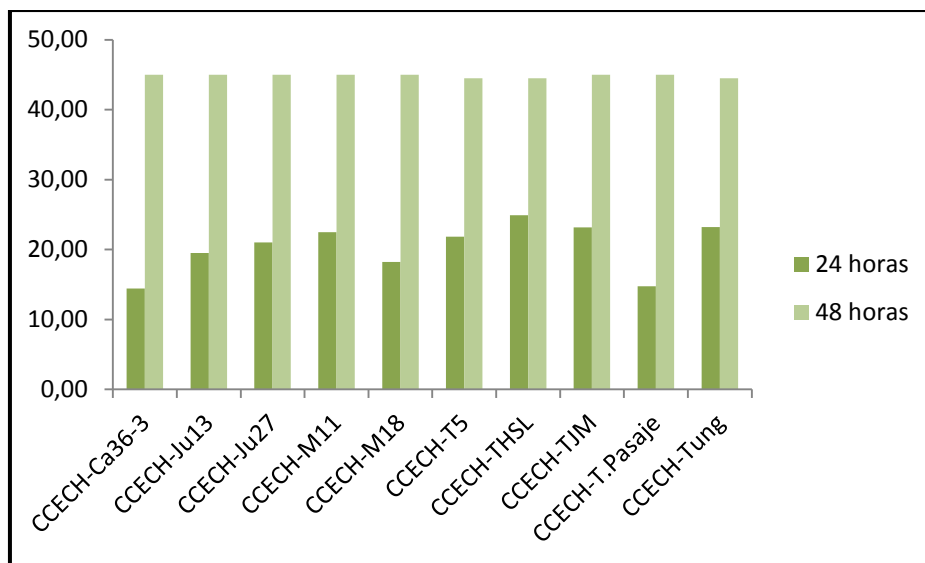


Figura 8-37: Ritmo de crecimiento radial de las cepas de *Trichoderma* spp. a las 24 y 48 horas en mm.

Fuente: Valeria Flores

A las 48 horas el antagonista *Trichoderma* spp. cubrió por completo las cajas petri por lo que ya no es factible realizar el correspondiente análisis estadístico.

Estos resultados son corroborados por Rivas, C. 1994, quien realizó el estudio de crecimiento radial del antagonista *Trichoderma pseudokoningii*, obteniendo el crecimiento total del antagonista en la caja petri al cabo de las 72 horas.

Aunque generalmente las especies de *Trichoderma* son de crecimiento rápido y en pocas horas pueden cubrir la superficie de la caja de Petri, que un aislamiento sea de crecimiento lento no lo excluye como buen antagonista, ya que según Cundom *et al.* (2002), dicha característica, la tasa de crecimiento, no es obstáculo para que en tales hongos puedan encontrarse aislamientos de buen potencial antagónico (Hoyos-Carvajal, 2008).

3.1.5. Identificación Morfológica de 1 Cepa de *Mycosphaerella fijiensis*.

Las características culturales de las colonias fueron similares para todos los aislados en el medio de cultivo PDA (micelio superficial, aterciopelado, elevado, compacto y micelio estromático negro en el reverso de las colonias) (Figura 9) que coincidieron con las referidas por otros autores que han utilizado este medio de cultivo, que el desarrollo de este hongo en medio de cultivo es lento, una colonia sembrada a partir de un conidio alcanza un centímetro de diámetro luego de 38 días de

incubación a 26°C, variando la temperatura de crecimiento óptima desde 24 a 28°C (Meredith y Lawrence, 1969; Moulim-Perfoura y Mourichon, 1990). Los cultivos son elevados y estromáticos con una superficie velvética de coloraciones gris pálido, gris rosado oscura y gris pardo (Stover, 1976). Frecuentemente en una misma colonia se encuentran varias coloraciones. En medio PDA los colores que predominaron fueron: rosada, blanca, grises (gris claro), verde olivo; siempre el reverso de la colonia es negro o pardo oscuro (Acosta, 2013).

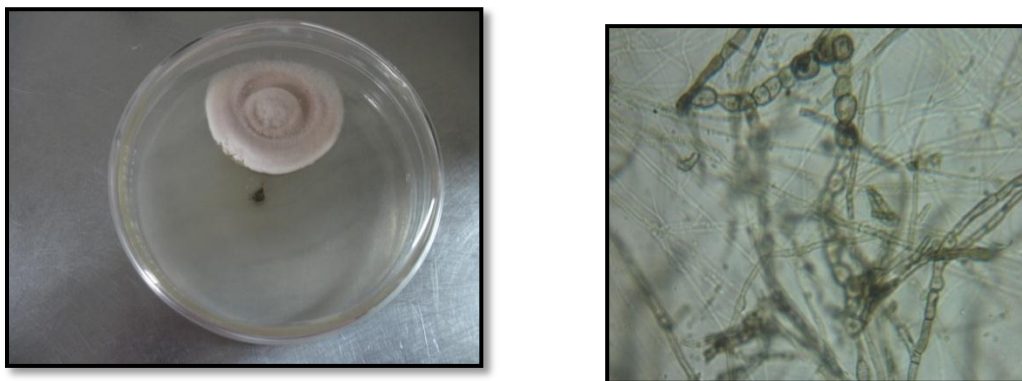


Figura 9-37: Crecimiento en medio de cultivo PDA y estructuras características de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet
Fuente: Valeria Flores

3.1.6. Identificación morfológica, y molecular de 10 cepas de *Trichoderma* sp.

Las características morfológicas de las cepas CCECH-Pasaje, CCECH-M18 y CCECH-Ca36-3 pertenecen al género *Trichoderma harzianum* describiendo así: Conidios de forma elipsoidal, ornamentación suave y pigmentación verde, Conidióforos con pelos estériles derivados de conidióforos o pústula ausentes, pelos fértiles derivados de conidióforos o pústula ausentes y pústulas no formadas o vagamente formadas, Fiálides con una longitud de 6.5-6.7 μm , fiálides proliferantes en verticilos de 2-4, punto medio (1.6-)2.5-3.5(-4.5) μm , base (1.0-)1.6-2.5(-3.5) μm , soporte celular (1.5-)2.4-3.6(-5.6) μm , relación entre la longitud y el punto más ancho 2.1-2.2 μm , relación entre la longitud y el apoyo a la célula (1.0-)1.5-3.0(-9.5) μm , relación entre la parte más ancha de la anchura de apoyo de células (0.3-)0.5-0.9(-1.6) μm , fiálides intercalares no forma, Clamidosporas de forma redonda a elipsoidales con un ancho de (4.0-6.0)a (9.7-15.0) μm , Medio de cultivo donde el radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 30°C después de 72h crece 42.7-49.1 mm, el radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 35°C después de 72 h crece 34.5 - 41.3 mm, el radio de la colonia en SNA en la oscuridad a 35°C después de 72 h crece 27.7 – 35.0 mm, no presenta olor distintivo, no crece sobre PDA a 40 °C. Ascosporas de forma cilíndrica y verrugosa, color verde, distal longitud parcial de (2.8-) 3.3-4.1 (-4.8)

μm , proximal longitud parcial de (2.9)-3.4-4.3 (-5.4) μm , proximal anchura parcial de (2.1-) 2.7-3.7 (-4.6) μm . (Anexo 1-6)

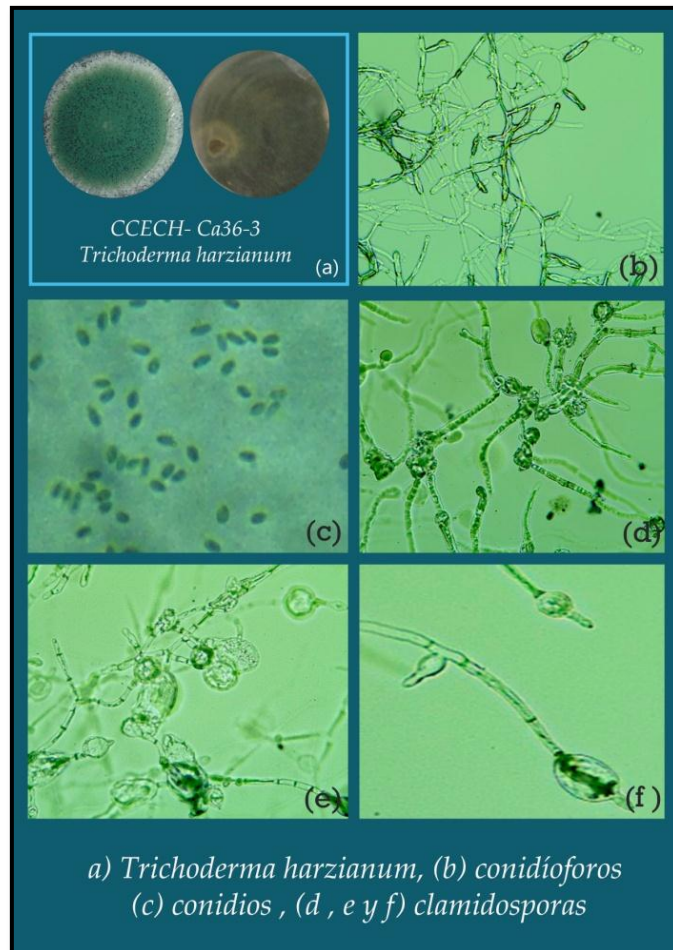


Figura 10-37: Identificación morfológica de *Trichoderma harzianum*
Fuente: Valeria Flores

La morfología de las cepas CCECH-M11, CCECH-T5 y CCECH-THSL pertenecen al género *Trichoderma pseudokoningii* describiendo así: Conidios de forma oblonga, ornamentación lisa y pigmentación verde oscuro, Conidióforos con pelos estériles derivados de conidióforos o pústula ausentes, pelos fértiles derivadas de conidióforos o pústula ausentes y pústulas no formadas, Fiálides con una longitud de (4.2-)6-10(-14) μm , fiálides proliferantes en verticilos de 3-4, punto medio (2.0-2.5) a (3.5 -4.5) μm , base (1.0-)1.6-2.5(-3.7) μm , soporte celular (1.8-)2.5-3.5(-4.5) μm , relación entre la longitud y el punto más ancho (1.2-)1.5-3.3(-5.9) μm , fiálides intercalares comunes, Clamidosporas de forma redonda a elipsoidales con un ancho de (4.0-6.0)a (9.7-15.0) μm . (Anexo 1-6)

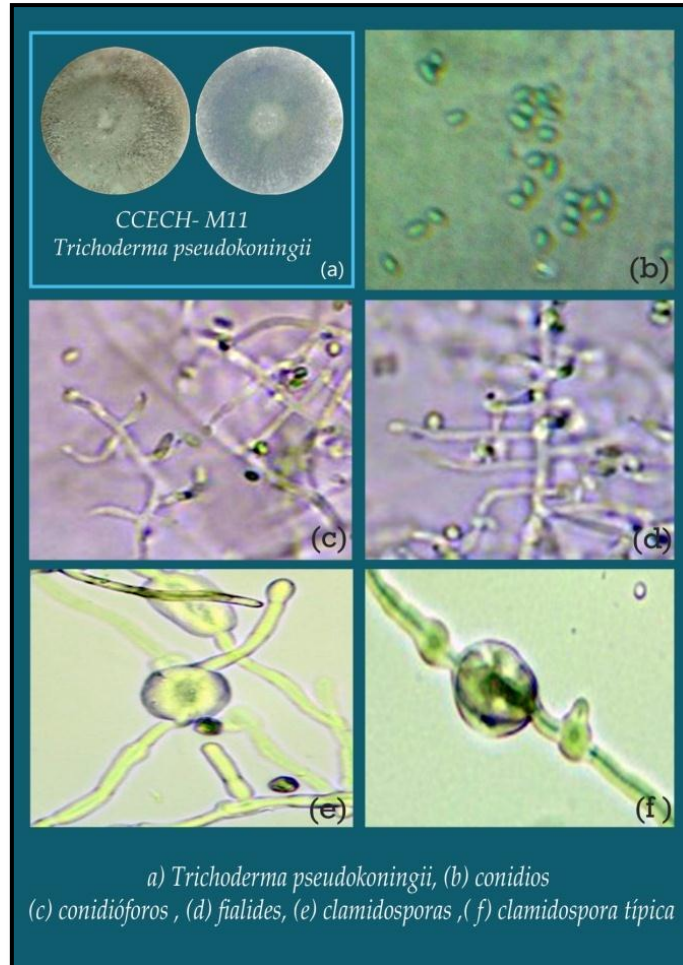


Figura 11-37: Identificación morfológica *Trichoderma pseudokoningii*.
Fuente: Valeria Flores

Trichoderma pseudokoningii al crecer en medio de cultivo presenta un radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 30°C después de 72h de 42.7-49.1 mm, el radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 35°C después de 72 h crece 34.5 - 41.3 mm, el radio de la colonia en SNA en la oscuridad a 35°C después de 72 h crece 27.7 – 35.0 mm, no presenta olor distintivo, no crece sobre PDA a 40 °C. Ascosporas de forma cilíndrica y verrugosa, color verde, distal longitud parcial de (2.8-) 3.3-4.1 (-4.8) μm , proximal longitud parcial de (2.9)-3.4-4.3 (-5.4) μm , proximal anchura parcial de (2.1-) 2.7-3.7 (-4.6) μm . (Anexo A-M)

De las 10 cepas estudiadas 2 que corresponden a los códigos CCECH-Tung y CCECH-Ju27 pertenecen al género *Trichoderma viride* describiendo así características como: Conidios de forma subglobosa, ornamentación granulada visible y pigmentación verde, Conidióforos con pelos estériles derivados de conidióforos o pústula ausentes, pelos fértiles derivadas de conidióforos o pústula ausentes y

pústulas 0.5-1.0 mm ϕ , semiesférica algodonosa, Fiálides con una longitud de (1.2-)2.2-3.2(-4.7) μm , fiálides proliferantes en verticilos de 2-3, punto medio (1.2-)2.2-3.2(-4.7) μm , base (1.7-2.2) a (3.2 - 4.5) μm , soporte celular (1.2-)2.2-3.2(-4.7) μm , Clamidosporas de forma globosa a subglobosa con un ancho de (8.0-8.5) a (10.5 -16.0) μm , Medio de cultivo donde el radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 30°C después de 72h crece 15-25 mm, el radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 35°C después de 72 h no crece, el radio de la colonia en SNA en la oscuridad a 35°C después de 72 h no crece, dulce a coco o no presenta olor distintivo, no crece sobre PDA a 40 °C. Ascosporas de forma cilíndrica, color hialina, distal longitud parcial de 2.9-)3.5-4.5(-5.2) μm , proximal longitud parcial de (3.0-)3.6-4.7(-5.7) μm , proximal anchura parcial de (2.1-)2.6-3.8(-4.6) μm . (**Anexo 1-6**)

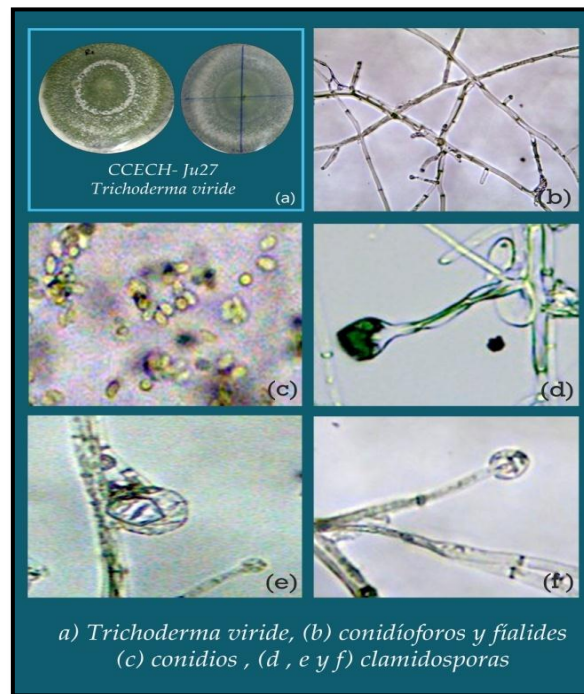


Figura 12-37: Identificación morfológica *Trichoderma viride*.

Fuente: Valeria Flores

La morfología de la cepa CCECH-TJM pertenece al género *Trichoderma koningii* describiendo así: Conidios de forma oblongo a estrechamente elíptico, ornamentación lisa y pigmentación verde, Conidióforos con pelos estériles derivados de conidióforos o pústula ausentes, pelos fértiles derivadas de conidióforos o pústula ausentes y pústulas 1.0-1.5 mm ϕ algodonosas, Fiálides con una longitud de (4.3-)6.2-10.2(-15.5) μm , fiálides proliferantes en verticilos de 3-4, punto medio (2.1-)2.7-3.5(-4.2) μm , base (1.0-)1.5-2.4(-3.0) μm , soporte celular (1.9-)2.5-3.2(-3.8) μm , Clamidosporas de forma globosa a subglobosa con un ancho de (6.7- 8.5) a (11.5 -14.7) μm , Medio de cultivo donde el radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 30°C después de 72h crece 33-45-52 mm, el radio de la colonia en PDA en la

oscuridad a 35°C después de 72 h 4.5 mm, el radio de la colonia en SNA en la oscuridad a 35°C después de 72 h no crece, no presenta olor distintivo, no crece sobre PDA a 40 °C. Ascosporas de forma subglobosa a cónica, color hialina, distal longitud parcial de 2.9-)3.8-5.2(-6.0) µm, proximal longitud parcial de (3.3-)4.0-5.4(-6.5) µm, proximal anchura parcial de (2.2-)2.5-4.2(-4.8) µm. (**Anexo A-M**)

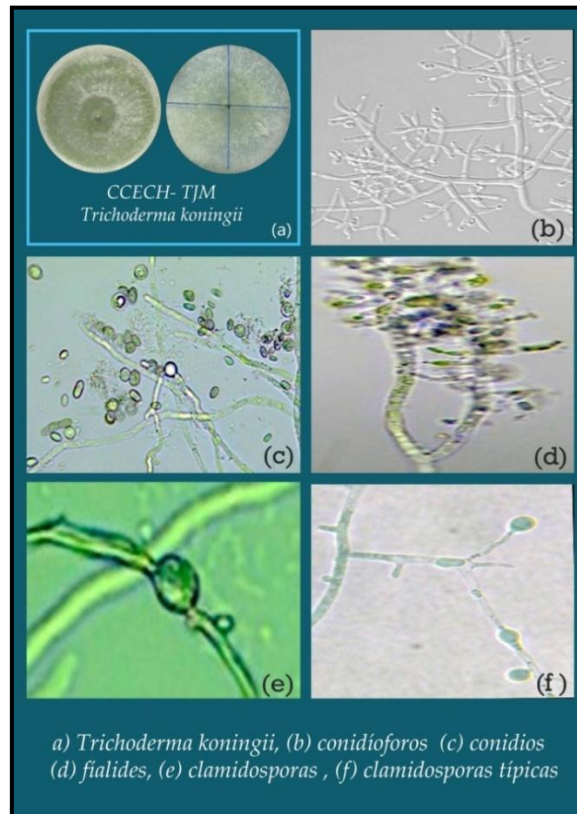


Figura 13-37: Identificación morfológica *Trichoderma koningii*.
Fuente: Valeria Flores

Las características morfológicas de la cepa CCECH-Ju13 pertenecen al género *Trichoderma longibranchiatum* describiendo así: Conidios de forma oblongos a elípticos, ornamentación lisa y pigmentación verde oscuro, Conidióforos con pelos estériles derivados de conidióforos o pústula ausentes, pelos fértiles derivadas de conidióforos o pústula ausentes y pústulas no formadas, Fiálides con una longitud de (5.0-)6.0-9.0(-10.0)µm, fiálides proliferantes en verticilos de 3, punto medio (1.0-)2.2-3.2(-4.2) µm, base (1.0-)1.5-2.2(-4.5) µm, soporte celular (1.2-)2.2-3.2(-4.7) µm, relación entre la longitud y el punto más ancho (1.0-)1.6-3.7(-7.3) µm, fiálides intercalares comunes y visibles, Clamidosporas de forma subglobosas a globosas con un ancho de (3,7-6,0) a (9,7-18,2)µm, Medio de cultivo donde el radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 30°C después de 72h crece 65-70 mm, el

radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 35°C después de 72 h 40-45 mm, el radio de la colonia en SNA en la oscuridad a 35°C después de 72 h no crece, sin olor distintivo, crece sobre PDA a 40 °C 13 - 44 -70 mm, Ascosporas no conocido. (Anexo A-M)

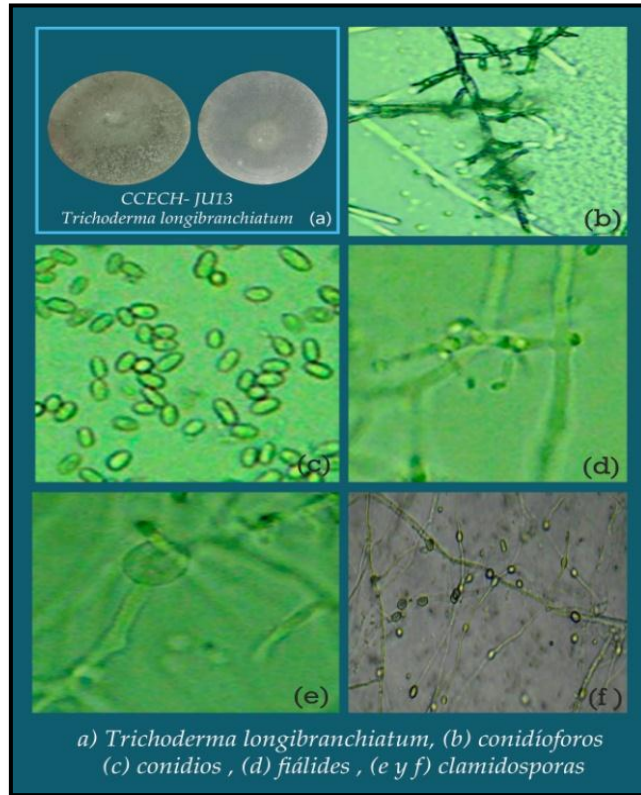


Figura 14-37: Identificación morfológica *Trichoderma longibranchiatum*.
Fuente: Valeria Flores

Sánchez Pérez (2009) obtuvo características de crecimiento de *Trichoderma* spp, colonias con formación de anillos blancos (micelio) y verde (esporas). Las colonias de las 16 cepas obtenidas presentaron características morfológicas distintas (color, forma y número de anillos, crecimiento, formación de esporas, pigmentación del medio de cultivo). Al microscopio se observaron hifas hialinas, fiálides en forma de matraz, tanto solitarias como en grupo, conidios de diversas formas (redondos, elipsoidales, elipsoidales oblongo) tanto chicos como grandes y en tonalidades verdes.

Castro (2014) ha propuesto que los caracteres útiles para la caracterización y la identificación de otros géneros de *Hyphomycetes* con frecuencia no son tan útiles en diferenciar las especies de *Trichoderma*, por lo general a causa de la reducida gama de variación de la morfología simplificada en *Trichoderma*, o porque los términos descriptivos para describir variación en el color o el patrón no son lo suficientemente precisos para definir las diferencias entre especies. Sin embargo, observaciones

morfológicas cuidadosas son a menudo suficientes para identificación de las especies y cepas de *Trichoderma*, al menos en la medida en que los taxones se han diferenciado morfológicamente adecuadamente y se describe en la literatura existente.

3.1.7. Identificación Molecular De *Trichoderma* sp.

Se caracterizaron 10 cepas nativas biocontroladoras de *Trichoderma* sp, con diferentes requerimientos nutricionales y alta similitud genética.

La extracción del ADN del material fúngico fue exitosa, todos los aislamientos presentaron la precipitación del ácido como se muestra en la figura 15.

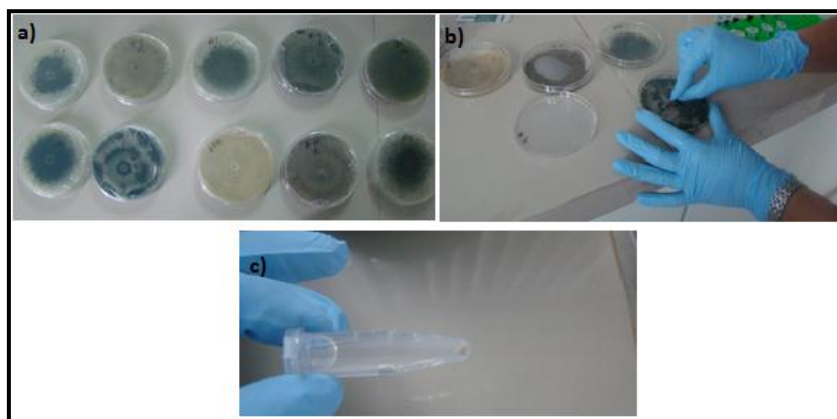


Figura 15-37:A) Cultivos de hongos frescos para extracción de ADN. B) Obtención de micelio fresco mediante raspa para extracción de ADN. C) Finalización de la extracción de ADN, precipitación del ácido (pellet) con isopropanol.

Fuente: Valeria Flores

3.1.7.1. Cuantificación de ADN:

El detalle de la cuantificación pureza del ADN de los aislados fúngicos se detalla en el cuadro 9.

Cuadro 9-12: Cuantificación y pureza de ADNs extraídos

Código Muestras	Pureza	Concentración ng/uL
#1	2.008	174
#2	2.287	322
#3	2.258	167
#4	2.282	127
#5	2.166	158
#6	1.986	283
#7	2.078	215
#8	2.036	67
#9	1.924	113
#10	1.994	105

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013)

3.1.7.2. Amplificación ITS1/ITS4:

La amplificación de las muestras presentó un amplicon de aproximadamente 560 pb como se muestra en la figura 16.



Figura 16-37: Amplificación de los marcadores ITS1/ITS4. M: marcador de talla. CP: control positivo de la reacción de amplificación. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013)

Cuadro 10-12: Identificación molecular de 10 cepas de *Trichoderma* sp por Secuenciación.

Muestra	SECUENCIA ITS 1 (PB)	VALOR Q (%)	SECUENCIA ITS 4 (PB)	VALOR Q (%)	SECUENCIA A CONSENSO (PB)	BLAST	% IDENTIDAD
1	537	89,9	500	80,2	445	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Hypocrea sp.</i> <i>Hypocrea pseudokoningii</i> <i>Hypocrea jecorina</i> <i>Hypocrea koningii</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma sp</i>	100 100 100 100 100 100 99 100
2	580	90	575	84,5	556	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Uncultures Hypocrea clone</i> <i>Hypocrea sp.</i> <i>Hypocrea pseudokoningii</i> <i>Hypocrea jecorina</i> <i>Hypocrea orientalis</i> <i>Hypocrea rufa strain</i> <i>Trichoderma cf.longibrachiatum</i> <i>Hypocrea cerebriiformis</i>	99 99 99 99 99 99 99 99 99 99
3	504	90,6	529	85,4	436	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Uncultured Hypocreaceae clone</i> <i>Hypocrea sp.</i> <i>Hypocrea pseudokoningii</i> <i>Trichoderma sp.</i> <i>Hypocrea pseudokoningii</i> <i>Hypocrea jecorina</i> <i>Hypocrea orientalis</i> <i>Trichoderma harzianum</i>	100 100 100 100 100 100 100 100 100 99
	634	82,4	548	51,5	555	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99

4						<i>Trichoderma viride strain</i>	99
						<i>Uncultured Hypocreaceae clone Bo-Arch-F1</i>	98
						<i>Hypocrea sp.SHWO6</i>	98
						<i>Hypocrea koningii strain</i>	98
						<i>Trichoderma sp.</i>	98
						<i>Hypocrea pseudokoningii strain S</i>	98
						<i>Hypocrea sp.</i>	98
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	98
						<i>Hypocrea orientalis</i>	98
						<i>Trichoderma cf. longibrachiatum</i>	
5	500	83,8	523	89,3	421	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100
						<i>Trichoderma viride</i>	100
						<i>Uncultured Hypocreaceae</i>	100
						<i>Hypocrea sp.</i>	100
						<i>Hypocrea koningii</i>	100
						<i>Trichoderma sp.</i>	100
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	100
						<i>Hypocrea jecorina</i>	100
						<i>Hypocrea orientalis</i>	100
<i>Trichoderma harzianum</i>	99						
6	617	82	554	81,2	524	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
						<i>Trichoderma viride strain</i>	99
						<i>Uncultures Hypocreaceae</i>	99
						<i>Hypocrea sp.</i>	99
						<i>Hypocrea koningii</i>	99
						<i>Trichoderma sp.</i>	99
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	99
						<i>Hypocrea orientalis</i>	99
<i>Hypocrea rufa</i>	99						
	713	74,1	556	80	558	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
						<i>Trichoderma viride</i>	99
						<i>Trichoderma sp.</i>	99
						<i>Hypocrea sp.</i>	99

7						<i>Hypocrea koningii</i>	99
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	99
						<i>Hypocrea orientalis</i>	99
						<i>Hypocrea lixii</i>	99
						<i>Hypocrea rufa</i>	99
8	583	87,8	547	82,3	532	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	97
						<i>Hypocrea orientalis</i>	97
						<i>Trichoderma harzianum</i>	96
						<i>Hypocrea rufa</i>	97
						<i>Trichoderma viride</i>	97
						<i>Trichoderma sp</i>	97
						<i>Hypocrea sp.</i>	97
						<i>Hypocrea lixii</i>	97
						<i>Hypocrea cerebriiformis</i>	97
						<i>Uncultured fungus clone LXH05</i>	96
						<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	97
9	626	82,7	552	83,7	535	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
						<i>Trichoderma viride</i>	99
						<i>Uncultures Hypocreaceae clone Bo-Arch-F1</i>	99
						<i>Hypocrea sp. SHW06</i>	99
						<i>Hypocrea koningii</i>	99
						<i>Trichoderma sp.</i>	99
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	99
						<i>Hypocrea orientalis</i>	99
						<i>Hypocrea rufa</i>	99
10	555	89	548	65,9	504	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
						<i>Trichoderma viride</i>	99
						<i>Uncultures Hypocreaceae</i>	99
						<i>Hypocrea sp. SHW06</i>	99
						<i>Hypocrea koningii</i>	99
						<i>Trichoderma sp.</i>	99
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	99

						<i>Hypocrea orientalis</i>	99
						<i>Trichoderma harzianum</i>	99

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013)

Secuencia Consenso Muestra 1: Código CCECH-Pasaje

CGGATCCCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCT
 CCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTC
 GAAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA
 GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
 ACATTGCGCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAA
 CCCCTCCGGGGGGTCCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGT
 GGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGC
 GCGGCCACAGCCGTAAAACAC

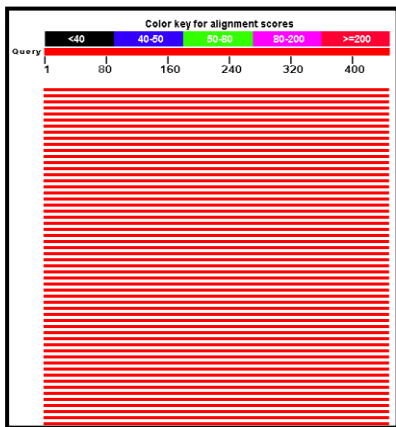


Figura 17-37: *Trichoderma harzianum* CCECH-Pasaje.

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013), Valeria Flores

Secuencia Consenso Muestra 2: Código CCECH-TJM

GTTTACACTCCCAACCCCATGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGC
 CCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAAACTCT
 TTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTCTCGG
 CGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCT
 GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
 ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGA

GCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCCCTCACCG
 GGCCGCCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCAC
 ACTCGCACCGGGAGCGCGGGCGGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTT
 GACCCTGGATCAGG

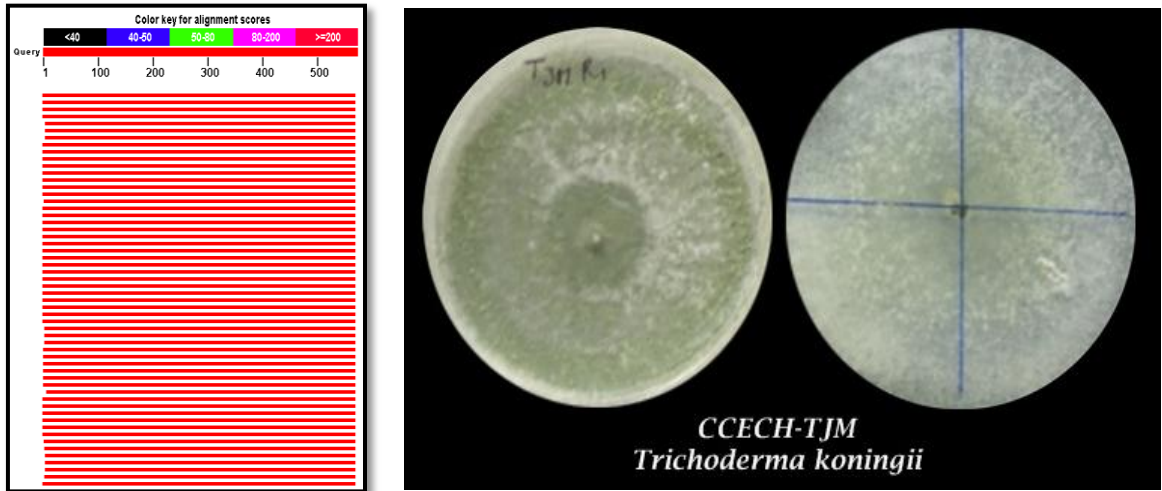


Figura 18-37: *Trichoderma koningii* CCECH-TJM.

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013), Valeria Flores

Secuencia Consenso muestra 3: Código CCECH-M11

CGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGCAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCCGGAGGAC
 CAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCT
 CTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAAC
 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCG
 GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGG
 ATCGGCCCCCTACCGGGCCGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTG
 CGCAGTAGTTTGA

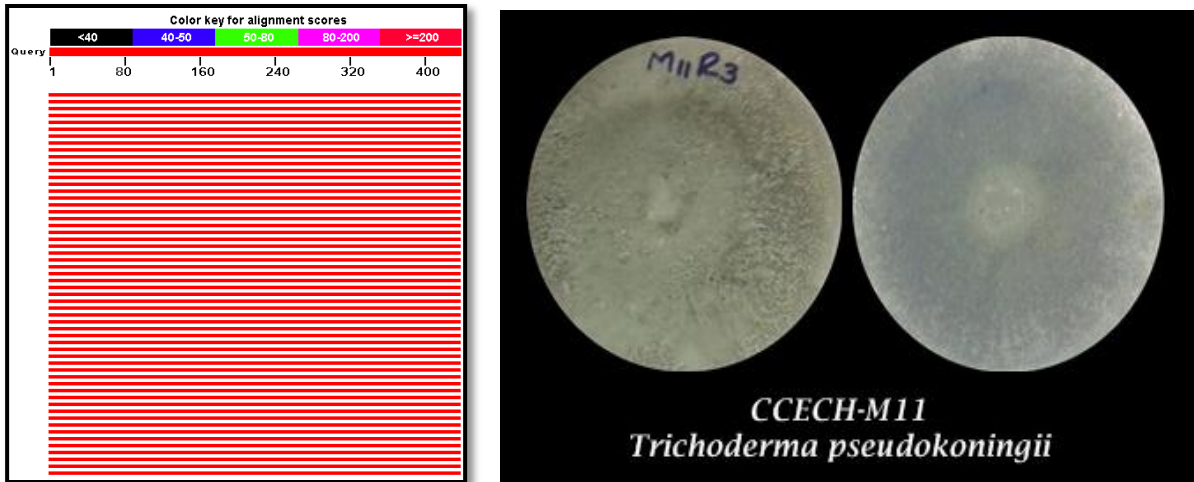


Figura 19-37: *Trichoderma pseudokoningii* CCECH-M11.

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013), Valeria Flores

Secuencia Consenso Muestra 4: Código CCECH-Tung

```

CAATGTGACGTTACCATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGCAGCC
CCGGATCCCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGC
TCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCT
CGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCG
AACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCCGGGCGCCCCAGAAATAC
AGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACTCGCACCCGGGAGCGC
GGCGCGGCCACAGCCGTAAAAACACCCCAAATTCTGAAATGTTGGACCTCGGGATCAAG
ATAGGGAATT

```

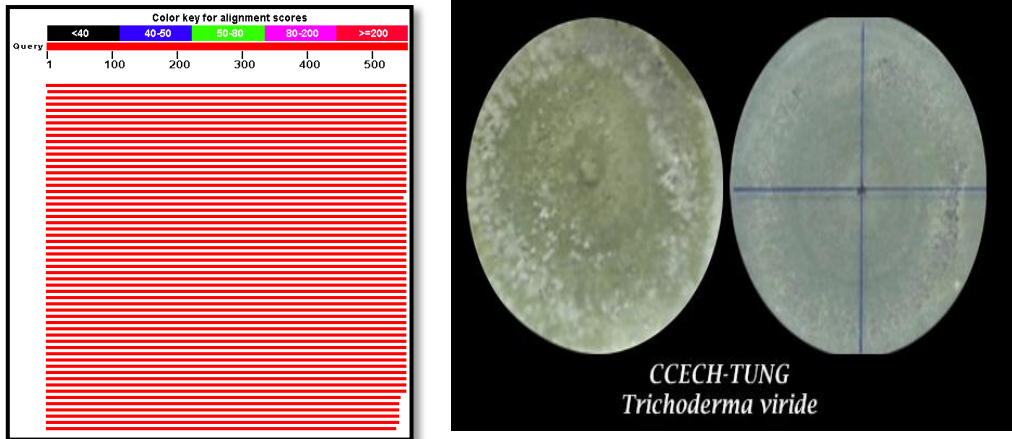


Figura 20-37. *Trichoderma viride* CCECH-Tung.

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013), Valeria Flores

Secuencia Consenso Muestra 5: Código M18

```

CTCTTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCC
AAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTGCTCTGAGCC
TTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCT
TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCT
GTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCC
TCACCGGGCCGCCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGT

```

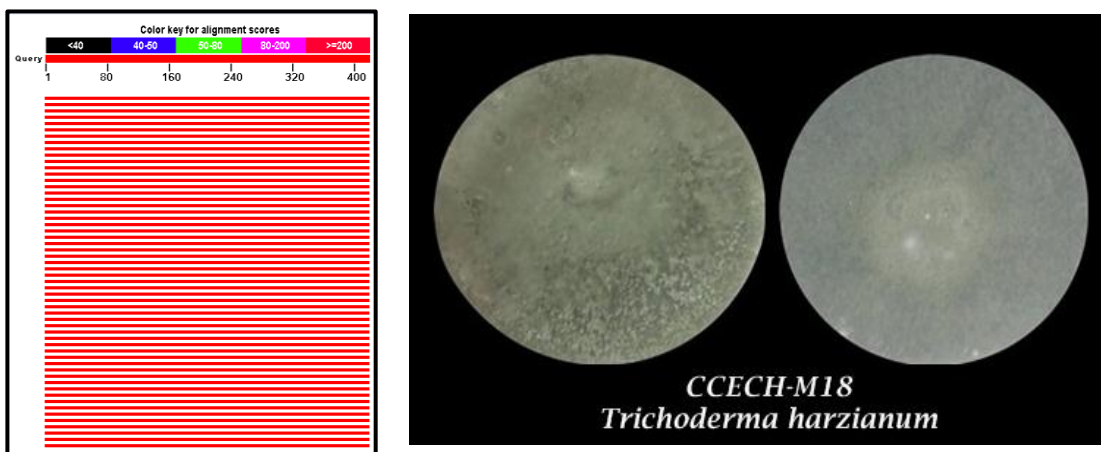


Figura 21-37: *Trichoderma harzianum* CCECH-M18.

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013), Valeria Flores

Secuencia Consenso Muestra 6: Código CCECH-Ju13

TGTAACGTTACCATCTGTTGCCTCGGCGGGGTTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCG
GATCCCATGGCGCCCCGCCGGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTTCGCGGCTCC
CGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGA
AAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAAC
CCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGTG
GCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCG
CGGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTT

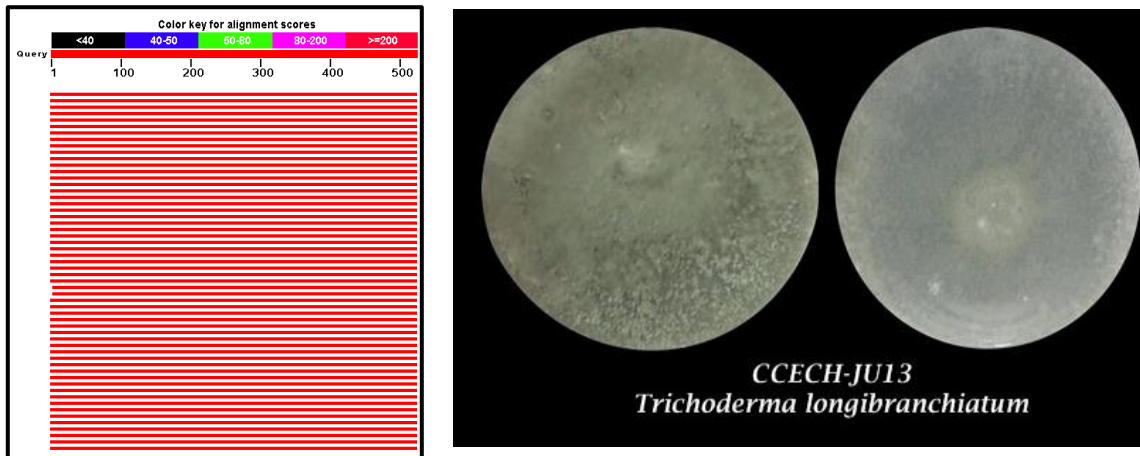


Figura 22-37: *Trichoderma longibranchiatum* CCECH-Ju13.

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013), Valeria Flores

Secuencia Consenso muestra 7: Código CCECH-Ju27

TGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGAGCCCCG
GATCCCATGGCGCCCCGCCGGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTTCGCGGCTCC
CGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGA
AAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAAC
CCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAG
TGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCG

GCGCGGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAAGGTAG
 GAATACCCGCTGA

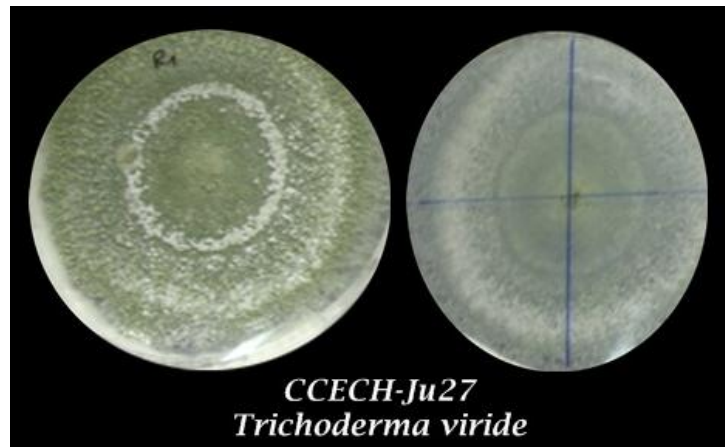
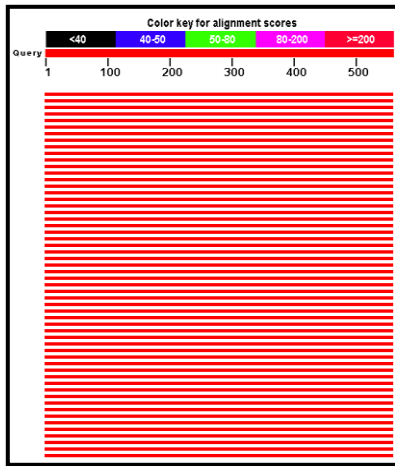


Figura 23-37: *Trichoderma viride* CCECH-Ju27

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013), Valeria Flores

Secuencia Consenso Muestra 8: Código CCECH-T5

GCAACGTTACCAACTTCTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCC
 GGATCCCATGGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGC
 TCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCT
 CGAAAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
 AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
 CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGA
 ACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCCGCCCCGAAATAC
 AGTGGCGGTCTCGCCGAGCCCTTCATGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGGAGC
 GCGGCGCGGCCACAGCCGTAAAACAACCCCAAATTTTTCTTGA

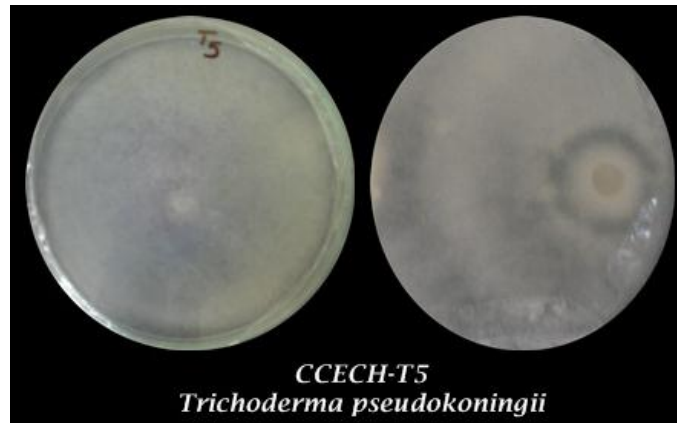
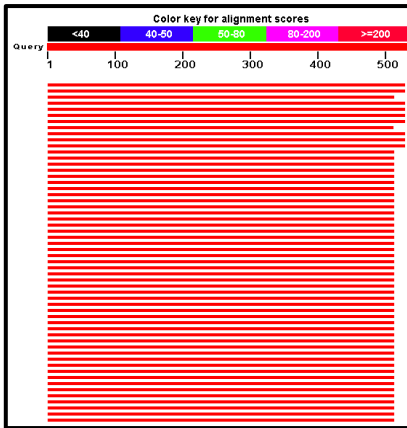


Figura 24-37: *Trichoderma pseudokoningii* CCECH-T5.

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013), Valeria Flores

Secuencia Consenso Muestra 9: Código CCECH-THSL

TGACGTTACCATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTTCGCAGCCCCGGG
 TCCCATGGCGCCC GCCGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGGCTCCCG
 TCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAA
 ATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
 AATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACAT
 TGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCC
 TCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCCGGGCGCCCCCGAAATACAGTGGC
 GGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGGCGCG
 GCCACAGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGGATCA

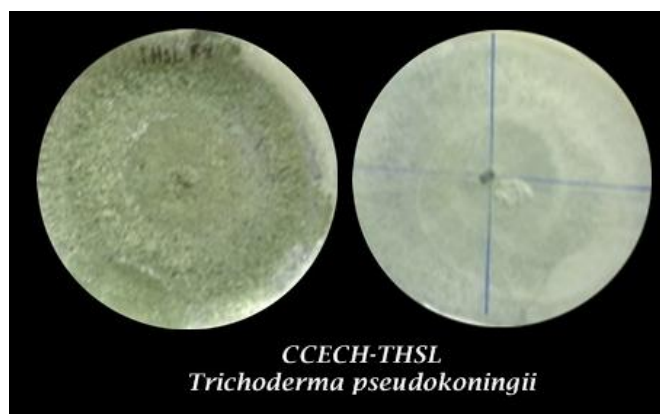
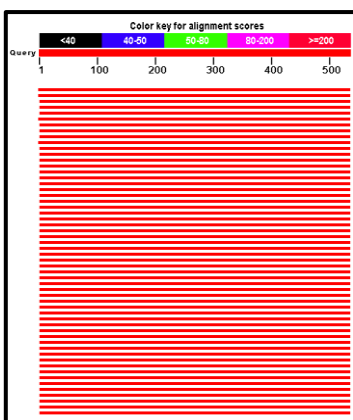


Figura 25-37: *Trichoderma pseudokoningii* CCECH-THSL.

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013), Valeria Flores

Secuencia Consenso Muestra 10: Código CCECH-Ca36-3

ACGTTTACCATCTGTTGCCTCGGCGGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGA
TCCCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCG
TCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGGACCCCTAGCGGGCGTCTCGAAA
ATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA
TTGCGCCC GCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCC
CTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGAAATACAGTGGC
GGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCCAGTAGTTTGCACACTCGCACCCGGGGAGCGCGGCG
CGGCCACAGCCGTA AAAAC

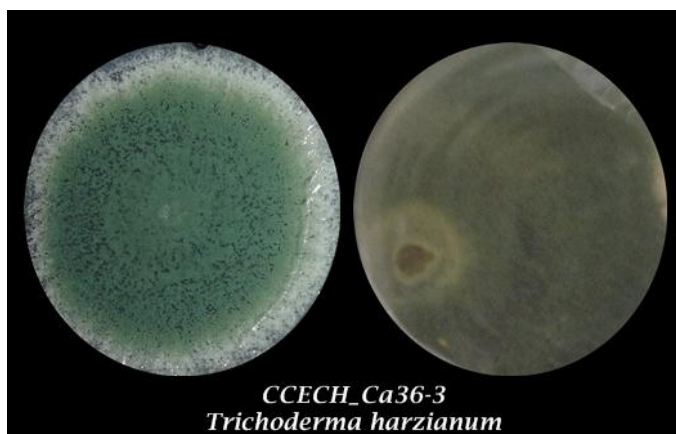
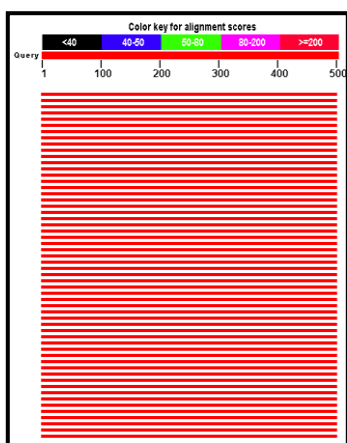


Figura 26-37: *Trichoderma harzianum* CCECH-Ca36-3.

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013), Valeria Flores

En general, al utilizar los marcadores moleculares se encontró una relación entre el agrupamiento de los aislamientos con la procedencia de cada uno de ellos, y se demostró la variabilidad existente entre los mismos, observándose que es una técnica confiable para la caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp. Estos resultados concuerdan con los señalados por Latha y Mukherjee (2002), quienes señalaron que los marcadores RAPD revelaron gran variabilidad inter e intraespecífica entre las cepas de *Trichoderma* examinadas. De igual manera, Góes *et al.* (2002) señalaron que el uso de RAPD permitió demostrar variabilidad entre los aislamientos de *Trichoderma* (Hernández *et al.*, 2013). La ubicación taxonómica de las cepas en estudio es importante ya que representa el punto de partida que permitirá un mejor diseño de experimentos y evaluar su actividad biológica bajo diferentes condiciones de crecimiento, determinar los mecanismos de acción que desarrollan y la interacción que

establecen con la planta. Esta información en conjunto facilitará la identificación de los organismos que pueden seleccionarse como antagonistas patógenos e inductores de resistencia en las plantas.

En el presente estudio se evidenció, al integrar los atributos moleculares con los criterios morfológicos que se usaron para la identificación de especies, la existencia de grupos dentro de *Trichoderma*, que pueden estar relacionados con diferentes niveles de actividad biológica. Además, apoyan la existencia de especies con características morfológicas y moleculares similares.

El análisis molecular de *Trichoderma* spp. corroboró que los atributos genéticos, pueden ser utilizados para ubicar los aislados en grupos o relacionarlos por áreas geográficas similares pero si lo que se persigue es la selección como inductores de resistencia o agentes de control biológico, deben realizarse pruebas bioquímicas y fisiológicas para determinar si tal diversidad, está relacionada con mecanismos de acción y posteriormente compararlos con los respectivos patrones moleculares.

Destacados investigadores verifican la complejidad de interacción de *Trichoderma* con la planta y beneficios, como la protección directa o a través de inducción, apoyados en caracterizaciones biológicas y moleculares (Chet 2008; Harman 2008; Lorito 2008; Jiménez *et al.* 2008; Pavone 2012; Zambrano *et al.* 2013ab;).

Muchas investigaciones se han realizado con *Trichoderma* desde simple aislamientos y multiplicación en los años 80 (Zambrano 1981) hasta la caracterizaciones moleculares realizadas por Pavone (2012) quien identifica las especies de *Trichoderma* analizando las mismas secuencias de los espaciadores transcritos internos del DNA ribosomal (ITS 1 y 2) y el factor de elongación de la traducción 1a (*tef1*) con los programas TrichOKEY, TrichoMARK y TrichoBLAST (www.isth.info) que se han utilizado en esta investigación y los resultados fueron certeros, además se debe evaluar la capacidad biocontroladora en cultivos duales en medio sólido y líquido; Jiménez *et al.* (2008), realizó análisis moleculares con marcadores RAPD, caracterizo 12 aislamientos de *Trichoderma* agrupando las procedencias del país por especies y también los perfiles enzimáticos de *Trichoderma* en diferentes aislamientos son evaluados por Bautista *et al.* (2008).

Castro (2014) propone que los estudios más altamente reproducibles son los que se realizan a nivel de ADN (moleculares). Actualmente para que un aislado sea reconocido como apropiadamente caracterizado requiere de al menos un método molecular que lo identifique como tal y en la fase de registro de un producto internacionalmente esta condición es exigida en países líderes en biocontrol.

Los estudios moleculares empleados en esta investigación, son los más usados en hongos para la caracterización son en los cuales se generan cortes por enzimas de restricción en el ADN dando lugar a fragmentos de diversas tallas, los que son puestos en contacto con sondas específicas marcadas con un cromógeno o con un isótopo radiactivo, que pueden o no acoplarse al o los fragmentos producidos por complementariedad de bases (hibridización) y luego de una electroforesis en gel de agarosa se genera un patrón de bandas en dependencia de la sonda de hibridización, el aislado y la enzima empleada en el corte del ADN, lo cual logra discriminar aislados aparentemente iguales como diferentes cepas, Castro (2014).

Mediante la identificación molecular de los aislados monoascospóricos obtenidos en el presente trabajo, se concluye que todos ellos pertenecen a la especie *Trichoderma* sp y que pueden ser utilizados para su posterior uso y ser probados en invernadero y campo a través de un bioformulado.

3.1.8. Determinación Del Tipo De Antagonismo

Los datos correspondientes al crecimiento de los dos hongos se encuentran en los Anexos 8-12. El análisis de varianza para las cepas de *Trichoderma* seleccionadas por su mayor velocidad de crecimiento frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, presenta diferencias altamente significativas entre las cepas con un coeficiente de variación de 5.73% y una media general de 58.52 mm a los 120 horas de crecimiento (Cuadro 8).

Cuadro 8-12: Análisis de Varianza para el antagonismo de 10 cepas de *Trichoderma* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet a las 120 horas.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado
Tratamiento	9	1193.356	132.595	11.777**
Error	20	225.184	11.259	
Total	29	1418.539		

Fuente: Valeria Flores

Esto concuerda con lo manifestado por D'Ercole, Sportelli y Nipoty (1984), en el sentido de que *Trichoderma* sp., establece la capacidad antagónica en base a la reducción del porcentaje de crecimiento de los patógenos.

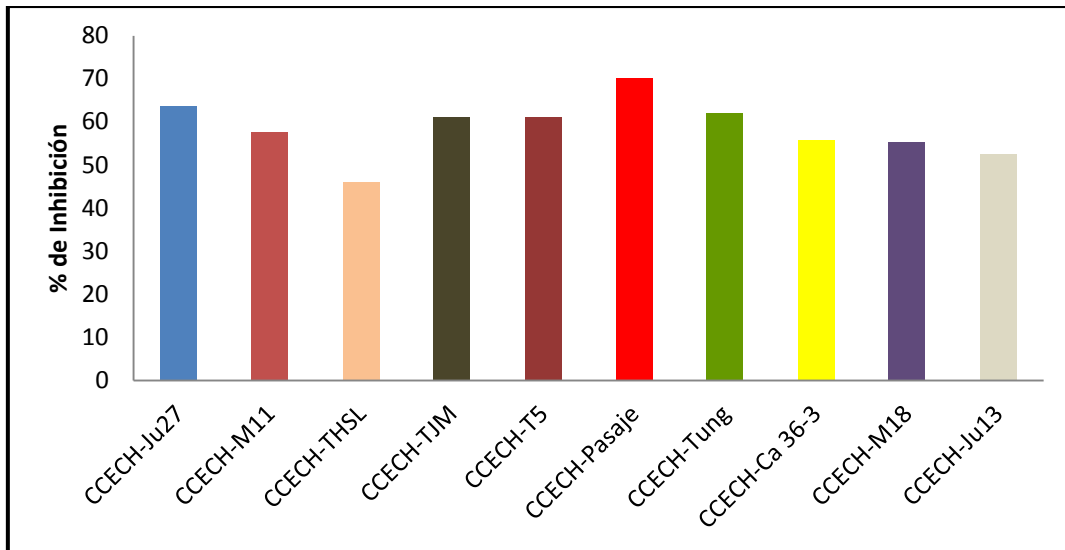


Figura 27-37: Prueba de Antagonismo de 10 cepas de *Trichoderma* spp. a las 120 horas frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

Fuente: Valeria Flores

La prueba de Tukey al 5% determina la existencia de 7 rangos, ubicándose en primer lugar con una media de 70.13% la cepa CCECH-Pasaje y en el último rango la cepa San Lorenzo con 45.93% de inhibición (Figura 9). Para el tipo e intensidad de antagonismo, la evaluación se realizó de manera visual a las 120 horas de incubación, observándose en su totalidad que las hifas del 100% de las cepas de *Trichoderma* recubrieron las del patógeno entrecruzándose o entrelazándose con *Mycosphaerella fijiensis* y ocupando el espacio vital, que de acuerdo a la escala sería Antagonismo tipo C, que corresponde a Hiperparasitismo. En lo referente a la intensidad de antagonismo predominó la intensidad de antagonismo elevado (++), pues el patógeno fue inhibido en su desarrollo en más del 25% con todas las cepas de *Trichoderma*.

El antagonismo es un mecanismo que se basa en la actividad inhibitoria directa que ejerce un microorganismo sobre otro y que presenta acciones opuestas en un mismo sistema. *Trichoderma* sp. pudo ejercer su acción antagonista sobre este fitopatógeno probablemente mediante el mecanismos conocido como micoparasitismo (hiperparasitismo).

Arzate *et al.*, en 2006, seleccionó ocho cepas para la prueba de cultivos apareados que fueron capaces de inhibir el crecimiento del micelio del fitopatógeno al menos un 45%, en su investigación titulada antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero, coincidiendo esto con nuestros resultados donde todas las cepas superan el 45% de inhibición frente al mismo patógeno.

Michel (2001), indica que entre menor sean los días al contacto, es mayor la agresividad que existe por parte del hongo antagónico y menor la resistencia del fitopatógeno. Hernández (2005) reporta contacto desde el segundo día después de la siembra entre *Trichoderma* spp y *S. rolfsii*; de igual forma Benhamou y Chet (1993) entre *T. harzianum* y *Rhizoctonia solani* Kuhm, en esta investigación el contacto entre los dos hongos fue a las 48 horas, lo cual demuestra que la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* es mayor a la de las cepas patógenas y además se observó que las esporas de *Trichoderma* tienen cierto tipo de energía cinética que les permite movilizarse, se adhieren y se enrollan a las hifas del patógeno ofreciendo así un control mecánico.

Por tanto, las pruebas *in vitro* para determinar la capacidad antagónica de un microorganismo con respecto a otro no representan necesariamente el grado de antagonismo y de control biológico en condiciones naturales, pero reflejan la capacidad y la variabilidad genética del antagonista y la del fitopatógeno de invadir o crecer en una caja de Petri o en condiciones *in vitro*. Es de anotar que dichas pruebas y la escala planteada permiten básicamente cuantificar competencia por nutrientes en el medio controlado, mas no cuantificar como tal el micoparasitismo o antagonismo; porque en tal caso se podría afirmar que si un aislamiento fitopatogénico tiene una tasa de crecimiento más rápida que el aislamiento de *Trichoderma*, entonces éste sería antagonista evaluado como grado 3, 4 y 5 en la escala de Royse y Ries (1978).

A pesar de que el patógeno se inoculó primero, según la técnica descrita por Royse y Ries (1978) para la realización de pruebas de antagonismo, debe haber un periodo de acondicionamiento del hongo fitopatogénico, el cual se ve reflejado en el crecimiento sobre el medio de cultivo y varía con respecto a la tasa de crecimiento de cada fitopatógeno (Hoyos-carvajal, 2008).

Estos resultados probablemente nos ayudan a determinar que aislamientos de una misma especie de *Trichoderma* son específicos en su actividad micoparasítica, por tanto, no se puede generalizar al decir que determinadas especies de *Trichoderma* son buenas antagonistas, ya que esto depende del aislamiento en particular y su capacidad de atacar de forma concreta a cepas. Esto es soportado por numerosos reportes de literatura en los cuales diversas especies de *Trichoderma* han sido reportadas como antagonistas en hongos formadores de esclerocios y es claro que son atributos de aislamientos particulares, no de especies (Elad *et al.*, 1980; Elad 1983; Hjeljord y Tronsmo, 1998; Howell, 2006; Hoyos-Carvajal, 2008).

Las pruebas de antagonismo *in vitro* permiten realizar la selección preliminar de aislamientos con rápido crecimiento en sistemas controlados, es decir, miden competencia, no así micoparasitismo, para el cual se requieren observaciones microscópicas en las que se vea una interacción directa entre estructuras del antagonista y del fitopatógeno y, en virtud a esto, evaluar la capacidad micoparasítica. Invariablemente, las pruebas de antagonismo *in vitro* requieren ser corroboradas en condiciones de invernadero y campo, porque no siempre los hongos que actúan como antagonistas bajo condiciones controladas tienen la capacidad potencial de usarse en el control biológico, como se ha demostrado en otros experimentos con aislamientos usados en este estudio (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008). Esto se debe a que el hongo antagonista puede modificar o actuar diferente de acuerdo con las características del suelo y las sucesiones microbianas particulares en sistemas *in vivo* (Garveba *et al.*, 2004).

Estos resultados son similares a los encontrados por Aimacaña 2007, quien determinó el efecto de aislamientos nativos de *Trichoderma* sp. colectados de fincas productoras de banano para controlar a *Paracercospora fijiensis*, forma asexual de *Mycosphaerella fijiensis* que causa la sigatoka negra, aisló *Trichoderma* sp., de diversas localidades en la provincia de El Oro y las caracterizó como *Trichoderma pseudokoningii*. El 97% de aislamientos de *Trichoderma pseudokoningii* mostraron efecto inhibitorio de micelio del patógeno bajo condiciones *in vitro* (Falconí, 2014).

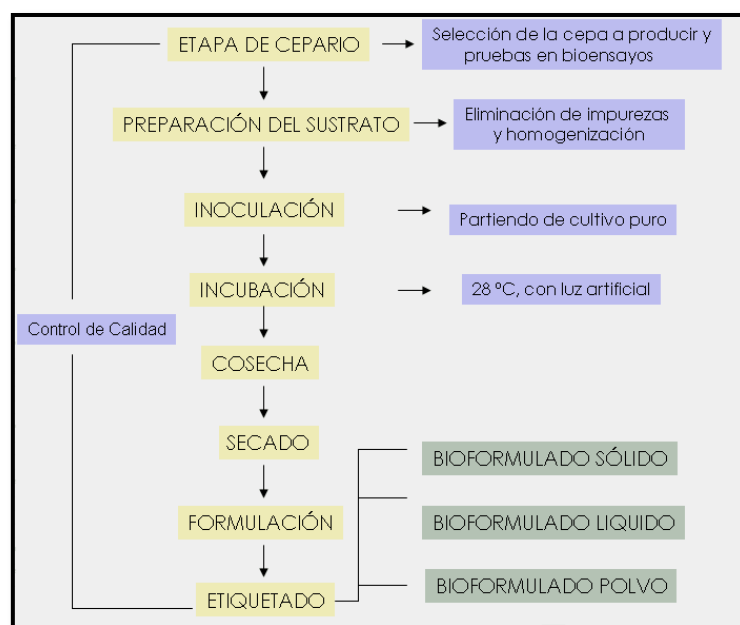
Otro estudio *in vitro* demostró buena actividad antagónica de *Trichoderma* sp., destacándose tres aislamientos que redujeron significativamente ($p < 0,05$) el crecimiento miceliar del patógeno. Análisis molecular de secuencias internas de transcripción (ITS) caracterizaron a los aislamientos eficientes como *Trichoderma viride* y *Trichoderma asperellum* (Cobos 2010). Estas son las bases para futuros estudios en campo y la posibilidad de controlar la sigatoka del banano mediante biopesticidas (Falconí, 2014).

En Mendoza, se probaron cepas de *Trichoderma* comerciales (europea y chilena) y autóctonas (de lechuga y frutilla) sobre cepas locales de *Botrytis cinerea* de vid. Las cepas de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento del patógeno en cultivos duales. Uno de los aislados locales resultó más eficiente (Lucero *et al.*, 2008). En otra investigación, se trabajó con ocho aislamientos de *Trichoderma* spp. de la región de Cuyo, se mezcló una alícuota de los filtrados culturales de cada aislamiento con conidios de *Botrytis cinerea*, y se observó disminución en la germinación de los conidios para todos los tratamientos con *Trichoderma* spp., con variación entre ellos, todos estos ensayos a nivel *in vitro*, lo que resulta interesante al comparar con los resultados obtenidos aquí, pues la actividad inhibitoria se asocia a metabolitos extracelulares (Hapon *et al.*, 2010).

Perelló *et al.* (2003) observaron mecanismos de antagonismo *in vitro* en cultivos duales de *Trichoderma* spp. y *Drechslera tritici-repentis* y atribuyeron a fenómenos de hiperparasitismo y plasmolización de las hifas y conidios de los patógenos, observaciones muy similares a las observadas en las 10 cepas nativas de *Trichoderma* de esta investigación al igual que en Corrientes, Lovato Echeverría (2009) obtuvo una colección de aislamientos de *Trichoderma* spp. de hojas, flores y rizósfera de plantas sanas de frutilla y evaluó su potencial antagonístico *in vitro* contra *Botrytis cinerea*. Como resultado, encontró diferencias en la disminución del crecimiento del patógeno. Todos los aislamientos presentaron formación de clamidosporas y micoparasitismo y algunos, antibiosis, destacándose tres de ellos.

De acuerdo a esta variable una cepa correspondiente al código CCECH-Pasaje identificada morfológica y molecularmente como *Trichoderma harzianum*, proveniente de la provincia de El Oro, cantón Pasaje del Grupo Agrícola Prieto Hacienda el Pío IV fue seleccionada por su velocidad de crecimiento y su antagonismo *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, para la siguiente fase que fue probarla a nivel de invernadero.

3.1.9. Diagrama De La Elaboración De Bioformulados Preparados A Base De *Trichoderma harzianum*.



Fuente: Fitopatología-Fichas Técnicas

3.1.9.1. Cuantificación De Esporas Del Bioformulado Líquido

El bioformulado líquido, fue almacenado a 4 °C durante los dos meses en los que se evaluó su crecimiento.

Para la determinación de la curva de crecimiento para *Trichoderma harzianum*, se empleó la cámara de Neubauer y se empleó el método de diluciones sucesivas para poder facilitar el conteo de esporas.

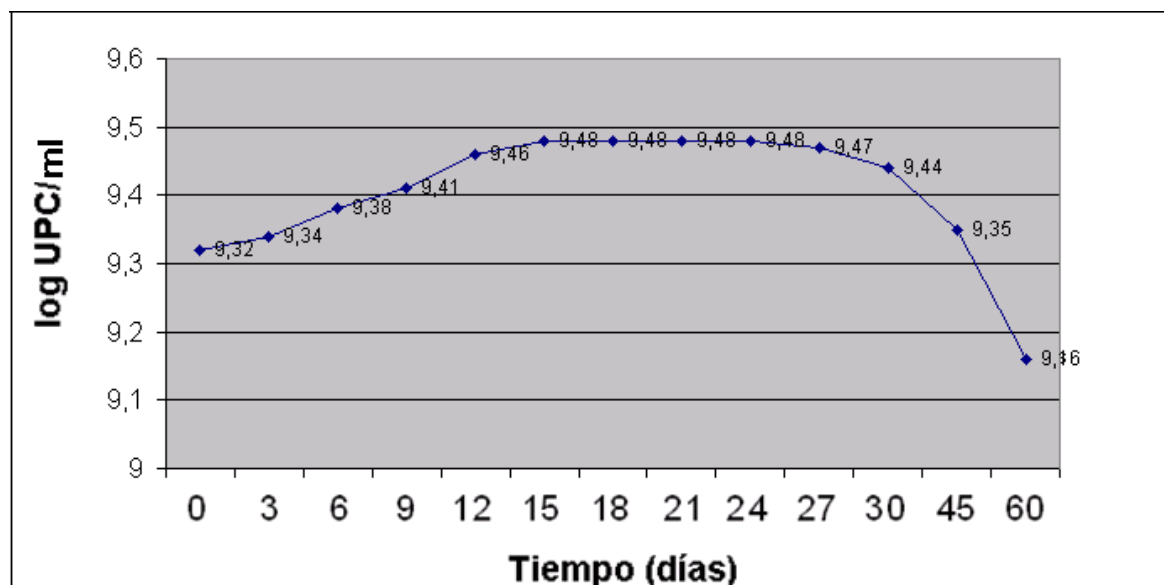


Figura 28-37: Curva de crecimiento del bioformulado líquido

Fuente: Valeria Flores

La curva de crecimiento del bioformulado líquido de *Trichoderma harzianum*, presenta la fase de crecimiento hasta los 15 días con una población de 3.05×10^9 UPC/ml de formulado, seguida de la fase estacionaria que se extiende hasta los 24 días, donde la concentración permanece constante, finalmente se presenta la fase de muerte obteniéndose una población final de 1.44×10^9 UPC/ml, al cabo de los 60 días de almacenado el producto.

3.1.9.2. Viabilidad Del Bioformulado Líquido

Al cabo de los 60 días de almacenado el producto se procedió a analizar la viabilidad del bioformulado, mediante el conteo de colonias por medio de la técnica de placa pobre con sistema de diluciones sucesivas, obteniéndose una población de 2.4×10^6 UPC/ml.

3.1.10. Actividad antagonista de las cepas de *Trichoderma* sp. Frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en plantas de banano ((cv. ‘williams’ (*Musa* AAA)) a nivel de invernadero.

4.1.10.1. Uso de variables epifitológicas

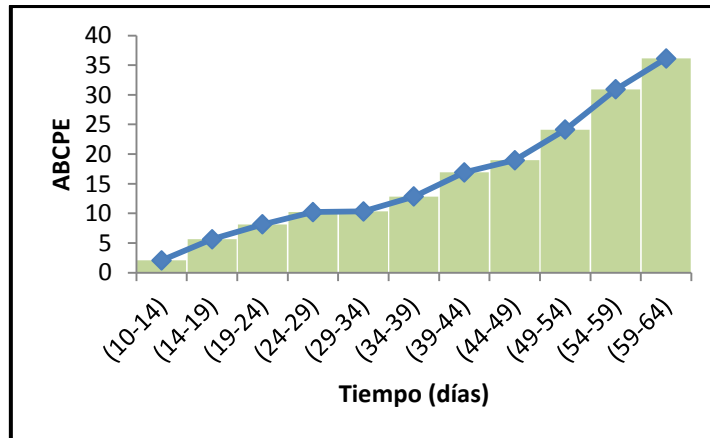


Figura 29-37: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para el tratamiento 3, Plantas de banano (cv. ‘Williams’ (*Musa* AAA)) inoculadas con *M. fijiensis*.

Fuente: Valeria Flores

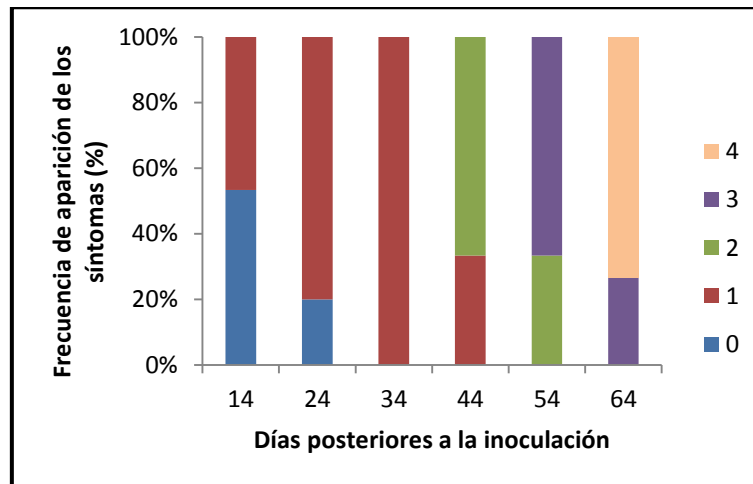


Figura 30-37: Evolución de los síntomas para el Tratamiento 3 (Plantas de banano cv. ‘Williams’ (*Musa* AAA) inoculadas con *M. fijiensis*) en casa de cultivo. Estados de síntomas (0-4) de acuerdo con escala propuesta por Alvarado-Capó et al. 2003.

Fuente: Valeria Flores

En la figura 29 se muestra el apareamiento de los síntomas en estado 1 (hojas con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz) se produce a partir del día 10 hasta los 38 días posteriores a la inoculación (dpi), el estado 2 (hoja con manchas de contornos

regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el envés de la hoja y sin síntomas por el haz) se presenta a partir de los 39 días (dpi) y se mantiene hasta los 53 días, el estado 3 (hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el haz) aparece a partir de los 54 días (dpi) y se mantiene hasta los 58 días, el estado 4 (hoja con manchas negras (elípticas o circulares) con bordes cloróticos y halo acuoso . La hoja mantiene áreas de tejido verde) aparece a partir de los 59 días (dpi) y se mantiene hasta los 64 días de evaluación del ensayo. Llegando a comprender un área bajo la curva de 36,13. Al término del experimento (64 dpi) como se muestra en la figura 30, cuando las hojas inoculadas con el patógeno alcanzaban los estados 3 y 4, el tiempo de evolución de los síntomas (TES) era de 50 dpi y el tiempo de desarrollo de la enfermedad (TDE) de 64 dpi, los síntomas no sobrepasaron el estado 4 (hoja con manchas negras (elípticas o circulares) con bordes cloróticos y halo acuoso. La hoja mantiene áreas de tejido verde).

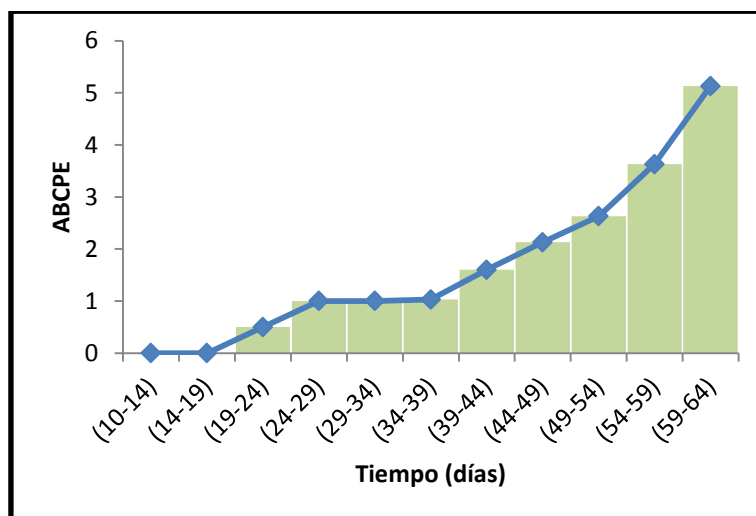


Figura 31-37: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para el tratamiento 4, Plantas de banano inoculadas con *M. fijiensis* y a las 72h después con *Trichoderma* cepa CCECH-Pasaje.

Fuente: Valeria Flores

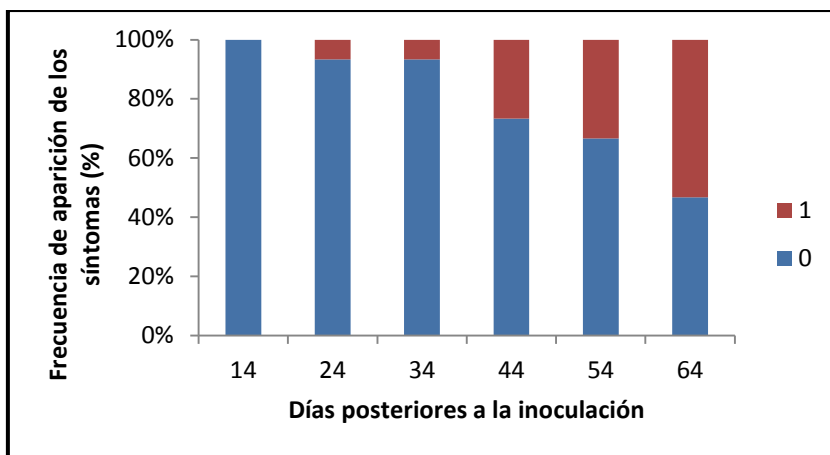


Figura 32-37: Evolución de los síntomas para el Tratamiento 4 (Plantas de banano cv. ‘Williams’ (Musa AAA) inoculadas con *M. fijiensis* y a las 72h después con *Trichoderma* cepa CCECH-Pasaje) en casa de cultivo. Estados de síntomas (0-1).
Fuente: Valeria Flores

En la figura 31 se observa el apareamiento de los síntomas en estado 0 (hoja sin síntomas) hasta los 18 días posteriores a la inoculación, el estado 1 (hoja con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz) aparece a partir de los 19 días (dpi) y se mantiene hasta los 64 días de evaluación del ensayo. Llegando a comprender un área bajo la curva de 5,13. Al término del experimento (64 dpi) como se presenta en la figura 32, cuando las hojas inoculadas con el patógeno y posteriormente inoculadas con *Trichoderma* cepa CCECH-Pasaje alcanzó el estado 1, el TES era de 45 dpi y el TDE de 64 dpi, los síntomas no sobrepasaron el estado 1.

En la figura 33 se observa el apareamiento de los síntomas en estado 0 (hoja sin síntomas) hasta los 58 días posteriores a la inoculación, el estado 1 (hojas con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz) aparece a partir de los 59 días (dpi) y se mantiene hasta los 64 días de evaluación del ensayo. Llegando a comprender un área bajo la curva de 0.07.

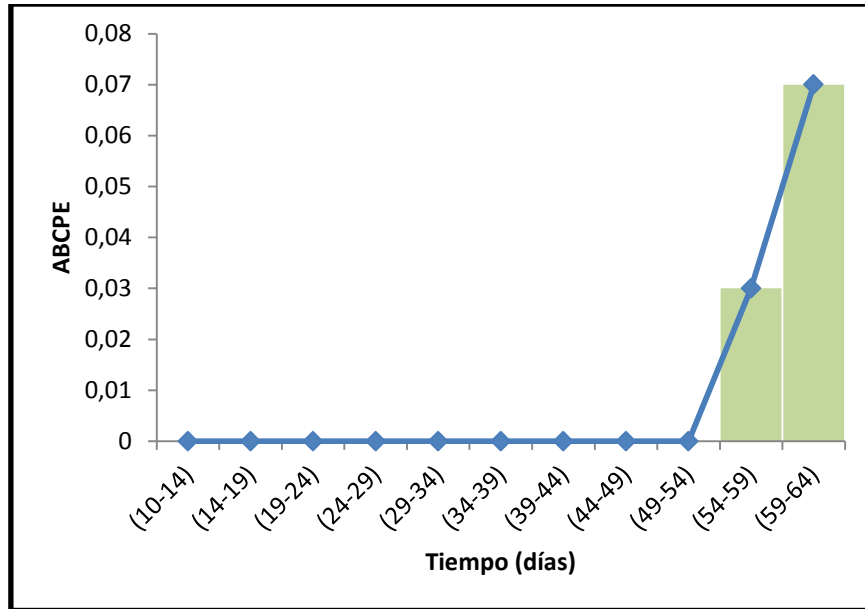


Figura 33-37: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para el tratamiento 5, Plantas de banano (cv. ‘Williams’ (Musa AAA)) inoculadas con *M.fijiensis* y a las 72h después con Trikofun.
Fuente: Valeria Flores

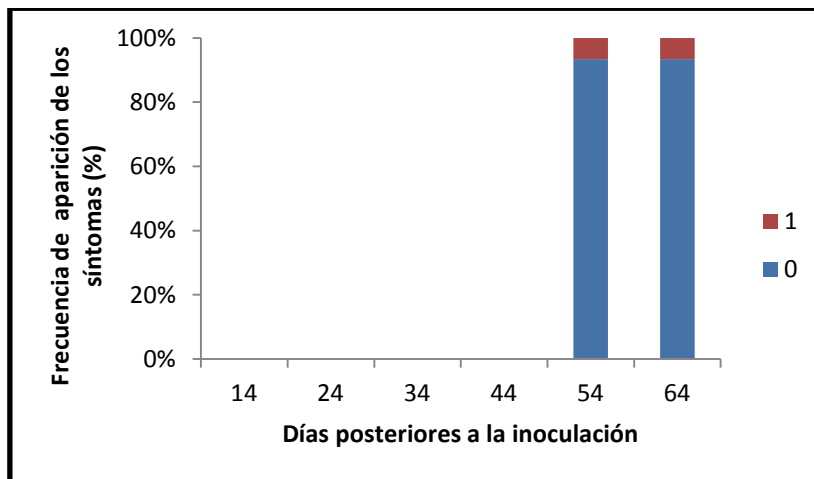


Figura 34-37: Evolución de los síntomas para el Tratamiento 5 (Plantas de banano cv. ‘Williams’ (Musa AAA)) inoculadas con *M. fijiensis* y a las 72h después con Trikofun en casa de cultivo. Estados de síntomas (0-1).
Fuente: Valeria Flores

Al término del experimento (64 dpi) como se presenta en la figura 34, cuando las hojas inoculadas con el patógeno y posteriormente inoculadas con Trikofun alcanzó el estado 1, el TES era de 44 dpi y el TDE de 64 dpi, los síntomas no sobrepasaron el estado 1.

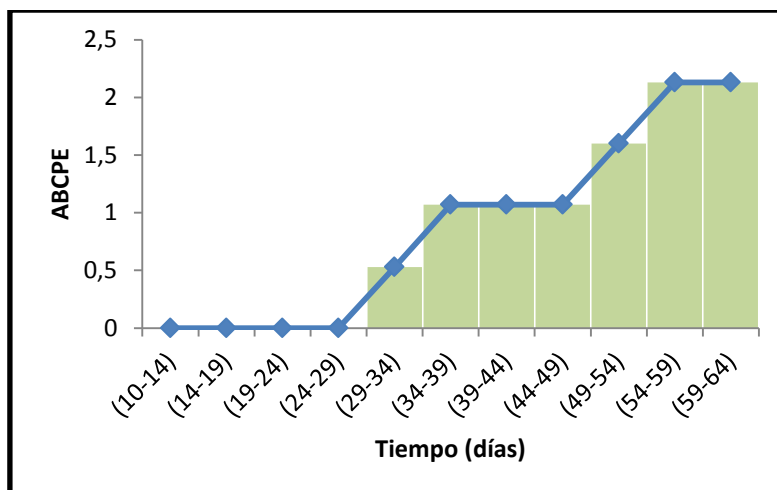


Figura 35-37: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para el tratamiento 6, Plantas de banano (cv. ‘Williams’ (Musa AAA)) inoculadas con componentes de la formulación de Trikofun (sin *Trichoderma*).

Fuente: Valeria Flores

La figura 35 muestra el aparecimiento de los síntomas en estado 0 (hoja sin síntomas) hasta los 33 días posteriores a la inoculación, el estado 1 (hojas con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz) aparece a partir de los 34 días (dpi) y se mantiene hasta los 53 días, el estado 2 (hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el envés de la hoja y sin síntomas por el haz) aparece a partir de los 54 días y se mantiene hasta los 64 días de evaluación del ensayo. Llegando a comprender un área bajo la curva de 2,13.

Al finalizar el experimento a los 64 dpi la figura 36 muestra que se alcanzó el estado 2, el TES era de 35 dpi y el TDE de 64 dpi, los síntomas no sobrepasaron el estado 2, a diferencia del tratamiento 3 que fue inoculado con *M. fijiensis* en el que los síntomas alcanzaron los niveles 3 y 4.

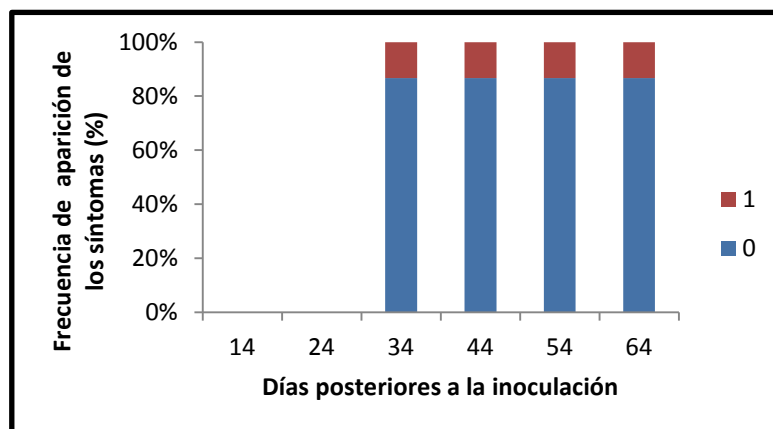


Figura 36-37. Evolución de los síntomas para el Tratamiento 6 (Plantas de banano cv. ‘Williams’ (Musa AAA) inoculadas con componentes de la formulación de Trikofun (sin *Trichoderma*)) en casa de cultivo. Estados de síntomas (0-1).
Fuente: Valeria Flores

La figura 37 muestra que en los Tratamientos 1 (T1), 2 (T2) y 7(T7), correspondientes a Plantas de banano cv. ‘Williams’ (*Musa AAA*) inoculadas con *Trichoderma* cepa CCECH-Pasaje, Plantas de banano inoculadas con Trikofun y Plantas sin inocular respectivamente, no se observa el apareamiento de síntomas (estado 0) hasta los 64 días de la evaluación del ensayo.

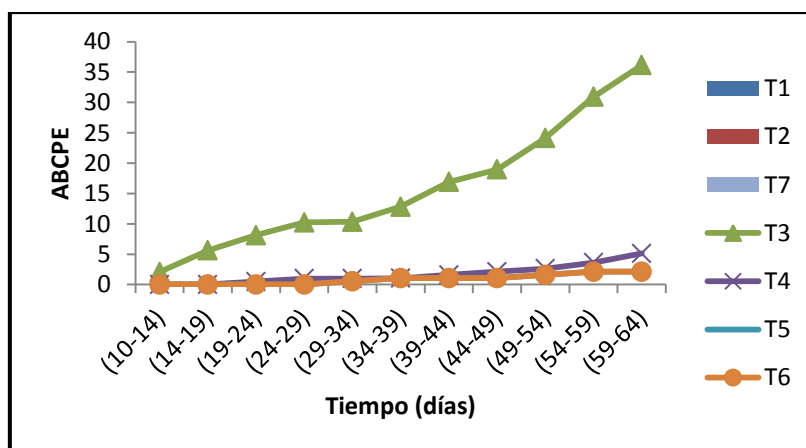


Figura 37-37: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para todos los tratamientos.
Fuente: Valeria Flores

El Tratamiento 3 (T3) correspondiente a Plantas de banano inoculadas con *M. fijiensis* las hojas sanas (estado 0) permanecen hasta el día 10 (dpi), y existe una evolución de síntomas hasta los estados 3 y 4. En los tratamientos 4 (T4) y 5 (T5) que corresponden a Plantas de banano inoculadas con *M. fijiensis* y

a las 72h después con *Trichoderma* cepa CCECH-Pasaje y Plantas de banano inoculadas con *M. fijiensis* y a las 72h después con Trikofun respectivamente se presenta una evolución de síntomas hasta el estado 1 (hojas con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz). Y en el tratamiento 6 (T6) (Plantas de banano (cv. 'Williams' (*Musa* AAA)) inoculadas con componentes de la formulación de Trikofun (sin *Trichoderma*) se produce una evolución de síntomas hasta estado 2. En las plantas donde se aplicó *Trichoderma* cepa CCECH-Pasaje, Trikofun y plantas sin inocular el TDE y el TDS no pudieron ser calculadas (> 64 dpi) ya que existió la ausencia de síntomas característicos durante todo el ensayo.

Los resultados descritos coinciden con Castro *et. al.* 2014, quien comprobó que la aplicación foliar de una cepa nativa de *Trichoderma* tuvo efecto sobre las variables epifitológicas Tiempo de evolución de los síntomas (TES) y tiempo de desarrollo de la enfermedad (TDE) en plantas de banano inoculadas artificialmente con *M. fijiensis*.

Indicando que el periodo de incubación coincidió con el control donde los primeros síntomas puntiformes aparecieron en el envés de las hojas a los 14 dpi. Sin embargo, se constató una reducción en la frecuencia de aparición de los síntomas. Solo el 13,3% de las plantas presentaban síntomas con respecto al 47,0% en el control. Posteriormente, en las hojas donde se aplicó el agente biológico no se observó el desarrollo de los síntomas hasta los estados de mancha necrótica (estados 4 y 5 de la escala propuesta por Alvarado-Capó *et al.* Al término del experimento (64 dpi) cuando las hojas inoculadas con el patógeno en el tratamiento control alcanzaban los estados 4 y 5 y el TES era de 50 dpi y el TDE de 64 dpi, en las plantas donde se aplicó *Trichoderma* estas variables no pudieron ser calculadas (> 64 dpi) . Los síntomas no sobrepasaron el estado 3 (manchas de contornos regulares o irregulares de color pardo rojizas por el haz).

Otros autores han informado del efecto inhibitorio de microorganismos o sus filtrados de cultivo en el desarrollo de síntomas ocasionados por *M. fijiensis* en banano en ensayos en casa de cultivo. Entre los factores a considerar están la cepa y el momento de aplicación. Por ejemplo, Arzate *et al.* evaluaron varias cepas de *Trichoderma* y comprobaron que dos cepas redujeron la infección ocasionada por el patógeno. Por su parte, Cruz-Martín *et al.* aplicaron en casa de cultivo filtrados de cultivo de cepas bacterianas después de la inoculación de *M. fijiensis* y mostraron evidencias de control del patógeno con una reducción del número de lesiones necróticas.

En los últimos años, investigaciones realizadas con *Trichoderma*, han mostrado entre sus distintos modos de acción que, la inducción de resistencia juega un papel fundamental en el control de plagas y enfermedades en varios cultivos de importancia económica (Harman 2006; Benítez *et al* 2004; Howell 2003). Dentro de este género, sobresale la especie *harzianum*, la cual ha mostrado un efecto en el control de enfermedades mediante inducción de resistencia. En el caso del cultivo de banano (en trabajos de investigación realizados en el CATIE), cuando este endofítico fue inoculado en la raíz de la planta, en presencia de un sustrato de broza de café, mostró una inducción de resistencia para el control de *M. fijiensis* tanto a nivel de invernadero como en campo con reducciones importantes en el control de la Sigatoka negra comparado con el testigo (Gutiérrez 1996; Camacho 1997). En fríjol, este mismo endofítico, indujo resistencia para el control de *Botrytis cinerea*, reduciendo en un 42% el área foliar afectada y disminuyendo el número de lesiones causado por este patógeno (Bijirimana *et al.* 1997). En tomate, mostró 3 meses después de su inoculación en la raíz de la planta, inducción de resistencia contra *Alternaria solani*, reduciendo en un 80% los síntomas de la enfermedad (Seaman 2003), mientras que en maíz, la respuesta de protección se evidenció 14 días después de su inoculación en la raíz de la planta, reduciendo en un 44% el daño de la enfermedad causada por *Colletotricum graminicola* (Harman *et al.* 2004).

Los modos de acción de *Trichoderma*: competencia por nutrientes y espacio en la rizosfera, antibiosis, micoparasitismo e inducción de resistencia (Harman 2006; Benítez *et al.* 2004; Howell 2003). De acuerdo a los modos de acción antes mencionados, estos mismos autores, coinciden en adjudicar a ciertos aislados especializaciones para un modo de acción en particular; de tal manera que, si un determinado aislado, es exitoso como promotor de crecimiento, este mismo, no necesariamente funciona eficientemente como controlador biológico o inductor de resistencia. Lo anterior, posiblemente se debe a la inversión en el costo energético para optimizar una respuesta en particular.

CAPITULO IV

4. IMPACTOS

4.1. Propuesta para la solución del problema

El problema de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en los cultivos de banano es la más seria a nivel mundial debido a las grandes pérdidas que causa en la producción, este hongo ataca las hojas, reduce la capacidad fotosintética de la planta, estima la maduración precoz, dañando la calidad de la fruta. Cuando la producción de banano se realiza con fines de exportación, se hace indispensable mantener el follaje libre de la enfermedad, aspecto que se logra parcialmente con la aplicación de fungicidas protectantes y sistémicos (Patiño, 2003), lo que representa un costo anual de cerca de 350 millones de dólares para América Latina (Peláez *et al.*, 2006.).

El control mediante químicos no solamente causa problemas económicos sino también ambientales. Por lo que es necesario desarrollar nuevas alternativas de control mediante la utilización de productos a base de extractos naturales que genere resistencia, estimule el crecimiento y que sean económicamente atractivos para los agricultores.

En esta investigación se propone la utilización de biofungicidas a base *Trichoderma*, ya que como agente de biocontrol es preventivo, en caso de ataque la planta está preparada y protegida para impedir algún tipo de acción fúngica. Esto ayuda a proporcionar un mayor rendimiento de los cultivos, mejorando la calidad de la fruta.

La producción y la comercialización de productos a base de *Trichoderma* son muy importantes pues nos conduce a una agricultura limpia en el que se considera el cuidado al medio ambiente y la salud de las personas, evitando el uso de agroquímicos y promoviendo al consumo de productos orgánicos por ser más sanos y saludables.

Los casos de intoxicación, malformaciones congénitas, otras enfermedades y trastornos producidos como consecuencia del uso indiscriminado de sustancias químicas en cultivos, han logrado que la agricultura orgánica tome mayor importancia en nuestros tiempos.

En el Ecuador este tipo de agricultura va tomando gran acogida entre los productores que la ven como una fuente rentable de ingresos.

La CORPEI mostró para el 2004 la proyección de la Agricultura Orgánica y su creciente mercado en el país. En el 2004 la producción orgánica ascendía a 31793 ha de las cuales 4076 ha estaban en proceso de certificación. Este estudio mostraba que la mayor cantidad de hectáreas dedicadas a la agricultura orgánica eran para Banano (*Musa acuminata*) y Orito(*Musa acuminata* AA), seguidas del Cacao (*Theobromacacao* L), Café (*Coffea arabica* L) y Palma Africana (*Elaeis guineensis*).

4.2. Costos de implementación de la propuesta

Cuadro 11-12. Costos Tratamiento Químico

PRODUCTOS	DOSIS		USD/APLICACIÓN	NÚMERO APLICACIONES/AÑO	TOTAL
	(mL/ha)	(Kg/ha)			
Folicur	400		33.02	6	198.12
Tilt	400		18.72	5	93.60
Strike	400		14.04	5	70.20
Oxitane		1.0	9.62	4	38.48
Pilarben		0.280	8.55	4	34.20
Amistar		0.125	34.39	5	171.95
Benocor		0.280	7.46	4	29.84
TOTAL				33	636.39

*Aplicaciones cada 15 días y 9 interciclos.

Fuente: Valeria Flores

Cuadro 12-12: Costos Tratamiento Biológico

PRODUCTOS	DOSIS		USD/APLICACIÓN	NÚMERO APLICACIONES/AÑO	TOTAL
	(mL/ha)	(Kg/ha)			
Trikofun	2000		12.83	33	423.39
TOTAL				33	423.39

Fuente: Valeria Flores

De acuerdo al análisis de costos el Tratamiento Químico tendría un valor de 636.39 USD/año/ha ya que se ocupan varios productos con 33 aplicaciones (una cada 15 días y 9 interciclos), mientras que el Tratamiento biológico tendría un valor de 423.39 USD ya que solo ocupa un producto con un valor de 12.83 USD por litro, lo que nos da una diferencia de 213,00 USD entre tratamientos, lo que involucra una reducción de los costos del control fitosanitario en un porcentaje del 30% menos frente a un manejo convencional con productos químicos.

4.3. Beneficios que aporta la propuesta

Al aplicar productos a base de *Trichoderma* a más de obtener productos orgánicos, permite el cuidado del ambiente evitando la contaminación del suelo ya que al poner en práctica este tipo de agricultura permitimos el enriquecimiento del suelo beneficiando a la microflora y microfauna propiciando sistemas más estables.

En muchas zonas agrícolas es un gran problema la contaminación de aguas subterráneas debido a la utilización de agroquímicos y fertilizantes mientras que en la agricultura orgánica se sustituye este tipo de plaguicidas sintéticos por abonos naturales como el compost y el estiércol animal, mejorando las capacidades para retener los nutrientes reduciendo el peligro de contaminación de aguas subterráneas.

La agricultura orgánica reduce la utilización de energía no renovable al disminuir la necesidad de sustancias agroquímicas (cuya producción requiere una gran cantidad de combustibles fósiles). La agricultura orgánica contribuye a mitigar el efecto de invernadero y el calentamiento del planeta mediante su capacidad de retener el carbono en el suelo. Muchas prácticas de gestión utilizadas por la agricultura orgánica (como la labranza mínima, la devolución de los residuos de las cosechas al suelo, la utilización de cubiertas vegetales y las rotaciones, así como la mayor integración de leguminosas que contribuyen a la fijación del nitrógeno), incrementan la devolución de carbono al suelo, lo que eleva la productividad y favorece el almacenamiento de carbono.

Los agricultores orgánicos son guardianes de la biodiversidad a la vez que la utilizan, en todos los niveles. En el plano de los genes, prefieren las semillas y las variedades tradicionales y adaptadas, por su mayor resistencia a las enfermedades y a las presiones del clima. En el plano de las especies, diversas combinaciones de plantas y animales optimizan los ciclos de los nutrientes y la energía para la producción agrícola. En cuanto al ecosistema, mantener zonas naturales dentro y alrededor de los campos de cultivo, así como que no se utilicen insumos químicos, propician un hábitat adecuado para la flora y la fauna silvestres. La utilización frecuente de especies subutilizadas (a menudo como cultivos de rotación para restablecer la fertilidad del suelo) reduce la erosión de la agrobiodiversidad y crea una reserva de genes más sana, que es la base de la futura adaptación. Al proporcionarse estructuras que ofrecen alimento y abrigo, y al no utilizarse plaguicidas, se propicia la llegada de especies nuevas (de tipo permanente o migratorio) o que otras anteriores vuelvan a colonizar la zona orgánica, especies de flora y de fauna -como algunas aves- y organismos benéficos para el sistema orgánico, como polinizadores y depredadores de las plagas.

CONCLUSIONES

- Se recolectaron muestras de suelo de las cuales se aisló y purificó el antagonista *Trichoderma* y se recolectaron también hojas de banano que presentaron síntomas de la enfermedad, de las cuales se aisló y purificó al agente causal *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.
- De las 10 cepas aisladas de *Trichoderma* se identificó molecular y morfológicamente de las cuales el 30% pertenecen a *T. harzianum*, el 30% a *T. pseudokoningii*, el 20% a *T. viride*, el 10% a *T. koningii* y el 10% a *T. longibranchiatum*.
- Se identificó morfológicamente 1 cepa de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.
- A nivel de invernadero los Tratamientos 1 (T1), 2 (T2) y 7(T7), correspondientes a Plantas de banano inoculadas con *Trichoderma* cepa Pasaje, Plantas de banano inoculadas con Trikofun y Plantas sin inocular respectivamente, no se observa el apareamiento de síntomas (estado 0) hasta los 64 días de la evaluación del ensayo, el Tratamiento 3 (T3) correspondiente a Plantas de banano inoculadas con *M. fijiensis* las hojas sanas (estado 0) permanecen hasta el día 10 (dpi), y existe una evolución de síntomas hasta los estados 3 y 4, el Tratamiento 4 (T4) que corresponde a Plantas de banano inoculadas con *M. fijiensis* y a las 72h después con *Trichoderma* cepa CCECH-Pasaje se presenta una evolución de síntomas hasta el estado 1 (hojas con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz), En el tratamiento 5 (T5) que corresponde a Plantas de banano inoculadas con *M.fijiensis* y a las 72h después con Trikofun se presenta una evolución de síntomas hasta el estado 1 (hojas con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz), el tratamiento 6 (T6) (Plantas de banano inoculadas con componentes de la formulación de Trikofun (sin *Trichoderma*) se produce una evolución de síntomas hasta estado 1.

RECOMENDACIONES

- En toda la cadena de producción de bioformulados a base de hongos antagonistas y entomopatógenos se debe efectuar los controles necesarios de calidad para garantizar el producto final.
- Valorar el uso de hongos del género *Trichoderma* sp. especialmente *Trichoderma harzianum* en el biocontrol fitopatológico de otras especies vegetales ya que es el de mayor capacidad antagónica en pruebas a nivel de laboratorio.
- Se recomienda utilizar y difundir la propuesta que se ha generado en esta investigación, con la finalidad de aprovechar al máximo los microorganismos benéficos con los que cuenta nuestro país y sus diferentes mecanismos de acción dentro de la agricultura, que servirá como base para la implementación de tecnologías en la producción de bioformulados a base de *Trichoderma*, para mantener el cuidado del ambiente y salud humana alcanzando la tan anhelada agricultura sustentable.
- Se deben realizar capacitaciones pertinentes a los agricultores tanto: sobre las ventajas que proporciona el uso de biocontroladores como alternativa diferente para el control de las principales enfermedades de sus cultivos; así como de los cuidados que se debe tener en cuenta al momento de manipular productos biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

ARZATE, J., MICHEL, A., DOMÍNGUEZ, V., SANTOS, O. 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 (Redalyc)*. Vol. 24. 2 de Julio 2006, México, pp, 15-20.

BAILEY, B., LUMSDEN. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. 2.ed, Nueva York-Estados Unidos. Taylor & Francis. 2005, pp. 21-28.

BARRERA, V. El género *Hypocrea* Fr. (Hypocreales, Ascomycota) en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico *Trichoderma*. (Tesis) (PHD en Biología). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas, Buenos Aires-Argentina. 2012, pp. 35-40.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/gsd1-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_5226_Barrera.
2014-09-15.

BARRIOS, M. A. Estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano. (Tesis) (MSc en Agricultura Ecológica). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Escuela de Posgrados, Turrialba-Costa Rica. 2006, pp. 43-52. <http://orton.catie.ac.cr/REPDO/A0991E/A0991E.PDF>.
2014-03-26

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C., CODÓN, A. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 2.ed., Rockville-Estados Unidos. Taylor & Francis. 2005, pp. 34-47.

BISSETT, J., SZAKACS, C.A. NOLAN, I. DRUZHININA, C. GRADINGER, and KUBICEK. New species of *Trichoderma* from Asia. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 81. Diciembre 2003, Ottawa- Canadá, pp. 570-586.

BIGIRIMANA, J. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med. Fac.Landbouww. Univ. Gent*, Vol. 62, pp. 1001–1007

CASTRO, R. Biotecnología en el Ecuador. *Revista Mundo Verde*. 2005, Ecuador, pp. 35-38.

CASTRO, R., PESÁNTEZ, M., ALVARADO-CAPÓ, Y. Efecto de una cepa nativa de *Trichoderma* spp. como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en casa de cultivo. *Biotecnología Vegetal*. 2014, Cuba, pp. 24-56.

CAMACHO, JC. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento e inductores de resistencia a Sigatoka negra (*M. fijiensis*) en banano (*Musa* sp.) y algunas observaciones sobre la gutación. (Tesis) (MSc en Fitoprotección). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Escuela de Posgrados, Turrialba-Costa Rica. 1997, pp. 122.

<http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0498E/A0498E.PDF>

2014-07-13

CAZCO, F. Evaluación in Vitro de la Eficiencia de 5 cepas de *Trichoderma harzianum* frente a 10 cepas de Sigatoka negra (*Cercospora fijiensis* M). (Tesis) (Ingeniero Agrónomo), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ingeniería Agronómica, Riobamba-Ecuador, 2003, pp. 36-52

2014-02-06

COBOS, G. Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el control de sigatoka negra (*Paracercospora fijiensis* M.) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio. (Tesis) (Ingeniera Agropecuaria). Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida, Santo Domingo-Ecuador, 2010, pp. 74-76.

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2893/1/T-ESPE-IASA%20II-002325.pdf>

2014-05-07

CUPULL, S.R., ANDRÉU, R., PÉREZ, N., DELGADO, P., AND CUPULL, S.M. DEL C. Efecto de *Trichoderma Viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Centro Agrícola, Cuba, pp. 35-54.

DOMSCH, K.H., W. GAMS, T., ANDERSON. Compendium of Soil Fungi: *Trichoderma*. Vol 1 Academic press , 1993, London (UK), pp. 794-809.

DRUZHININA, I., KOPCHINSKIY, KUBICEK. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* Vol. 3. 2003, Estados Unidos, pp. 47:55-64.

GUIGÓN-LÓPEZ C., GUERRERO-PRIETO V., VARGAS-ALBORES F., CARVAJAL-MILLÁN G., ÁVILA-QUEZADA D. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatogenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 28, núm. 2, 2010, México, pp. 87-96.

GÚZMAN, M. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. 2011

<http://www.infoagro.net/programas/Ambiente/pages/adaptacion/casos/Sigatoka.pdf>

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*. 2000, Estados Unidos, pp. 84: 377-393.

HARMAN, GE., HOWELL, RH., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. Vol. 2. 2004, pp. 43-56.

HARMAN, GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma harzianum* spp. *Phytopatology*, Vol. 96. 2006, Estados Unidos, pp. 190-194.

HOWELL, CR. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, Vol. 87, 2004, Estados Unidos, pp. 1, 4-10.

HOWELL. Aplicación de *Trichoderma*, modo de acción y potencial como un agente de control biológico de hongos patógenos de la planta. *Revista de Protección Vegetal*. Vol. 28. Abril 2003, Cuba, pp. 45-48.

MANZO, G. Diversidad Genética De *Mycosphaerella Fijiensis* Morelet En Plátano Enano Gigante (*Musa Acuminata* Aaa) Cultivado Con Diferente Manejo. (Tesis) (PHD en Biotecnología). Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y agropecuarias, Colima-México. 2011, pp. 35-49

<http://bvirtual.ucol.mx/textoscompletos.php?autor=759&id=5608>

2014-01-14

MARÍN, DH; ROMERO, RA; GUZMÁN, M; SUTTON, TB. Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. *Plant Disease*. Vol. 87, 2003, Estados Unidos, pp. 208-222

MARTÍNEZ, B., REYES Y. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz; *Rev. Protección Veg.* Vol. 23 2008, Cuba, pp. 56-58.

MARTÍNEZ, B., REYES, Y., INFANTE, D., GONZÁLEZ, E., BAÑOS, E., CRUZ, A. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz; *Rev. Protección Veg.* Vol. 23 2008, Cuba, pp. 56-58.

MOREANO, J. Implementación de una Nueva Variedad de Banano para Incrementar la Productividad del Cultivo. (Tesis) (Ingeniero Agropecuario). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil-Ecuador, 2009, pp. 36-40.

<http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/10283>

2014-07-24

PÉREZ, L. Morfología de las especies de *Mycosphaerella* asociadas a manchas de las hojas en *Musa* spp. *Redalyc*. Vol. 6. Junio 2002, Cuba, pp. 23-36.

PESÁNTEZ, M. Fichas Técnicas. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Laboratorio de Fitopatología. 2003

SÁNCHEZ, M. Aislamiento y Caracterización Molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. nativos del norte de Tamaulipas. (Tesis) (MSc en Biotecnología Genómica.). Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Tamaulipas-México. 2009, pp. 56-60.

<http://itzamna.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/8464/1/53.pdf>

2014-06-09

RECALDE, C., ECHEVERRÍA, M., CASTRO, R. Descomposición de materia orgánica con microorganismos benéficos magnetizados. *Scielo*. Vol. 24. 2013, Ecuador, pp. 26-28.

ROMERO, R. Caracterización y manejo de la resistencia a fungicidas de *Mycosphaerella fijiensis* en bananos. *Scielo*. Vol. 4. México, pp. 15-18.

MARIN, D; ROMERO, R; GUZMÁN, M; SUTTON, T. Black Sigatoka and increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease Phitopathology*. Vol. 87. No.3. Septiembre 2007, Estados Unidos, pp. 18-21.

STEFANOVA, M., LEIVA, A., LARRINAGA A., CORONADO, M. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Scielo*. Vol. 24. Abril 2009, Cuba, pp. 36-40.

ANEXOS

Anexo A: Características de los conidios de 10 cepas de *Trichoderma* sp.

CÓDIGO Y SITIO DE RECOLECCIÓN	ESPECIE	CONIDIOS					
		Forma	Longitud µm	Ancho µm	Relación L/A	Ornamentación	Pigmentación
CCECH-Pasaje Hcda. Pio IV	<i>T. harzianum</i>	elipsoidal	2	1.7	1.1	Suave	verde
			2.4	2.3	1.0		
			2.9	2.5	1.2		
			4.5	3.7	1.2		
			4.8	4	1.2		
CCECH-TJM Hcda. Grupo Marún	<i>T. koningii</i>	Oblongos a estrechamente elípticos	3.0	1.9	1.5	Lisos	verde
			3.5	2.5	1.4		
			4	3.1	1.2		
			4.5	4	1.1		
			5	4.3	1.1		
CCECH-M11 Hcda. Lilita	<i>T. pseudokoningii</i>	oblongos	2.7	1.2	2.2	Lisos	verde oscuro
			4.8	2.3	2.0		
			6.6	3.6	1.8		
			8.3	4.7	1.7		
			9.7	5	1.9		
CCECH-Tung Hcda. Kimberly	<i>T. viride</i>	subglobosas	3.1	2.6	1.1	Granulada visible	verde
			3.2	2.9	1.1		
			3.2	3.4	0.9		
			3.3	4	0.8		
			3.5	4.4	0.8		

CCECH-M18 La Izquierda	<i>T. harzianum</i>	elipsoidal	2	1.8	1.1	Suave	verde
			2.5	2.4	1.0		
			3	2.5	1.2		
			4.6	3.7	1.2		
			4.9	4	1.2		
CCECH-Ju13 Carretera	<i>T. longibrachiatum</i>	Oblongos a elípticos	2.5	2	1.2	Lisos	verde oscuro
			3.8	2.5	1.5		
			4.9	3	1.6		
			5.7	3.5	1.6		
			7.8	4	1.9		
CCECH-Ju27 Hcda. Los Ángeles	<i>T. viride</i>	subglobosas	2.9	2.5	1.1	Granulada visible	verde
			3	2.6	1.1		
			3.2	3.1	1.0		
			3.3	4	0.8		
			3.4	4.3	0.8		
CCECH-T5 Agrícola El Rosario	<i>T. Pseudokoningii</i>	oblongos	2.6	1.3	2.0	Lisos	verdes
			3.9	2	1.9		
			5.7	2.9	1.9		
			7.9	3.6	2.1		
			9.8	4.9	2.0		
CCECH-THSL San Lorenzo	<i>T. Pseudokoningii</i>	oblongos	2.5	1.2	2.0	Lisos	verde
			4.6	2.8	1.6		
			6.5	3.5	1.9		
			7.9	4.7	1.6		
			9.7	5	1.9		
CCECH-Ca36-3	<i>T. harzianum</i>	Redonda a	2.1	1.8	1.1	Suave	verde

Hcda.Agrícola del Pacífico		subglobosa	2.9	2.3	1.2		
			3.2	2.9	1.1		
			3.8	3.5	1.1		
			4.8	4	1.2		

Fuente: Valeria Flores

Anexo B: Características de los conidióforos de 10 cepas de *Trichoderma* spp.

CÓDIGO Y SITIO DE RECOLECCIÓN	ESPECIE	CONIDIÓFOROS			
		Pelos estériles derivados de conidióforos o pústula	Pelos fértiles derivadas de conidióforos o pústula	Pústulas	Conidios secos o mantenidos en gotas de líquido claro
CCECH-Pasaje Hcda. Pio IV	<i>T. harzianum</i>	Ausentes	Ausentes	No formadas o vagamente formadas	No
CCECH-TJM Hcda. Grupo Marún	<i>T. koningii</i>	Ausentes	Ausentes	1.0-1.5 mm ϕ Algodonosas	No
CCECH-M11 Hcda. Lilita	<i>T. pseudokoningii</i>	Ausentes	Ausentes	No formadas	No
CCECH-Tung Hcda. Kimberly	<i>T. viride</i>	Ausentes	Poco visibles	0.5-1.0 mm ϕ Semiesférica Algodonosas	No
CCECH-M18 La Izquierda	<i>T. harzianum</i>	Ausentes	Ausentes	No formadas o vagamente formadas	No
CCECH-Ju 13 Carretera	<i>T. longibrachiatum</i>	Ausentes	Ausentes	No formadas	No
CCECH-Ju 27 Hcda. Los Ángeles	<i>T. viride</i>	Ausentes	Poco visibles	0.5-1.0 mm ϕ Semiesférica	No

				Algodonosas	
CCECH-T5 Agrícola El Rosario	<i>T. Pseudokoningii</i>	Ausentes	Ausentes	No forman	No
CCECH-THSL San Lorenzo	<i>T. Pseudokoningii</i>	Ausentes	Ausentes	No forman	No
CCECH-Ca36-3 Hda. Agrícola del Pacífico	<i>T. harzianum</i>	Ausentes	Ausentes	No formadas o vagamente formadas	No

Fuente: Valeria Flores

Anexo C: Características de las fiálides de 10 cepas de *Trichoderma* spp.

CÓDIGO-SITIO DE RECOLECCIÓN Y ESPECIE	FIÁLIDES							
	Longitud μm	Fiálides proliferantes	Punto medio μm	Base μm	Soporte celular	Relación entre la longitud y el punto más ancho	Relación entre la longitud y el apoyo a la célula	Relación entre la parte más ancha de la anchura de apoyo de células
CCECH-Pasaje Hcda. Pio IV <i>T. harzianum</i>	6.5-6.7 μm	En verticilos de 2-4	(1.6-2.5-3.5(-4.5) μm	(1.0-)1.6-2.5(-3.5) μm	(1.5-)2.4-3.6(-5.6) μm	2.1-2.2 μm	(1.0-)1.5-3.0(-9.5) μm	(0.3-)0.5-0.9(-1.6) μm
CCECH-TJM Hcda. Grupo Marún <i>T. koningii</i>	(4.3-)6.2-10.2(-15.5)	En verticilos de 3-4	(2.1-2.7-3.5(-4.2) μm	(1.0-)1.5-2.4(-3.0) μm	(1.9-)2.5-3.2(-3.8) μm	(1.2-)1.8-3.8(-6.6) μm	_____	_____
CCECH-M11 Hcda. Lilita <i>T. pseudokoningii</i>	(4.2-)6-10(-14)	En verticilos de 3-4	(2.0-2.5) a (3.5 - 4.5) μm	(1.0-)1.6-2.5(-3.7) μm	(1.8-)2.5-3.5(-4.5) μm	(1.2-)1.5-3.3(-5.9) μm	_____	_____
CCECH-Tung Hcda. Kimberly <i>T. viride</i>	(1.2-)2.2-3.2(-4.7) μm	En verticilos de 2-3	(1.2-2.2-3.2(-4.7) μm	(1.7-2.2) a (3.2 - 4,5) μm	_____	_____	_____	_____
CCECH-M18 La Izquierda <i>T. harzianum</i>	6.5-6.7 μm	En verticilos de 2-4	(1.6-2.5-3.5(-4.5) μm	(1.0-)1.6-2.5(-3.5) μm	(1.5-)2.4-3.6(-5.6) μm	2.1-2.2 μm	(1.0-)1.5-3.0(-9.5) μm	(0.3-)0.5-0.9(-1.6) μm

CCECH-Ju 13 Carretera T. <i>longibrachiatu m</i>	(5.0-)6.0- 9.0(-10.0)	En verticilos de 3	(1.0-)2.2- 3.2(-4.2) µm	(1.0-)1.5- 2.2(-4.5) µm	(1.2-)2.2- 3.2(-4.7) µm	(1.0-)1.6-3.7(- 7.3) µm	—	—
CCECH-Ju 27 Hcda. Los Ángeles T. <i>viride</i>	(1.2-)2.2- 3.2(-4.7) µm	En verticilos de 2-3	(1.2-)2.2- 3.2(-4.7) µm	(1.2-)2.2- 3.2(-4.7) µm	—	—	—	—
CCECH-T5 Agrícola El Rosario T. <i>Pseudokoningii</i>	(4.2-)6-10(- 14)	En verticilos de 3-4	(2.0-2.5) a (3.5 - 4.5) µm	(1.0-)1.6- 2.5(-3.7) µm	(1.8-)2.5- 3.5(-4.5) µm	(1.2-)1.5-3.3(- 5.9) µm	—	—
CCECH-THSL San Lorenzo T. <i>Pseudokoningii</i>	(4.2-)6-10(- 14)	En verticilos de 3-4	(2.0-2.5) a (3.5 - 4.5) µm	(1.0-)1.6- 2.5(-3.7) µm	(1.8-)2.5- 3.5(-4.5) µm	(1.2-)1.5-3.3(- 5.9) µm	—	—
CCECH-Ca36- 3 Hcda.Agrícola del Pacífico T. <i>harzianum</i>	(4.2-)6-10(- 14)	En verticilos de 3-4	(2.0-2.5) a (3.5 - 4.5) µm	(1.0-)1.6- 2.5(-3.7) µm	(1.8-)2.5- 3.5(-4.5) µm	(1.2-)1.5-3.3(- 5.9) µm	(4.2-)6-10(-14)	En verticilos de 3-4

Fuente: Valeria Flores

Anexo D: Características de las clamidosporas de 10 cepas de *Trichoderma* spp.

CÓDIGO Y SITIO DE RECOLECCIÓN	ESPECIE	CLAMIDOSPORAS		
		Presencia	Ancho μm	Forma
CCECH-Pasaje Hcda. Pio IV	<i>T. harzianum</i>	Si	(4.0-6.0)a (9.7-15.0)	redondas a elipsoidales
CCECH-TJM Hcda. Grupo Marún	<i>T. koningii</i>	Si	(6.7- 8.5) a (11.5 -14.7	globosa a subglobosa
CCECH-M11 Hcda. Lilita	<i>T. pseudokoningii</i>	Si	(3.3-5.0) a (8.5 -16.5)	subglobosas a globosas
CCECH-Tung Hcda. Kimberly	<i>T. viride</i>	Si	(8.0-8.5) a (10.5 -16.0)	globosa a subglobosa
CCECH-M18 La Izquierda	<i>T. harzianum</i>	Si	(4.0-6.0)a (9.7-15.0)	redondas a elipsoidales
CCECH-Ju13 Carretera	<i>T. longibrachiatum</i>	Si	(3,7-6,0) a (9,7-18,2)	subglobosas a globosas
CCECH-Ju27 Hcda. Los Ángeles	<i>T. viride</i>	Si	(8.0-8.5) a (10.5 -16.0)	globosa a subglobosa
CCECH-T5 Agrícola El Rosario	<i>T. Pseudokoningii</i>	Si	(3.3-5.0) a (8.5 -16.5)	subglobosas a globosas

CCECH-THSL San Lorenzo	<i>T. Pseudokoningii</i>	Si	(3.3-5.0) a (8.5 -16.5)	subglobosas a globosas
CCECH-Ca36-3 Hcda.Agrícola del Pacífico	<i>T. harzianum</i>	Si	(4.0-6.0)a (9.7-15.0)	redondas a elipsoidales

Fuente: Valeria Flores

Anexo E: Características medio de cultivo de 10 cepas de *Trichoderma* spp

CÓDIGO Y SITIO DE RECOLECCIÓN	ESPECIE	MEDIO DE CULTIVO				
		El radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 30°C después de 72 h.	El radio de la colonia en PDA en la oscuridad a 35°C después de 72 h.	El radio de la colonia en SNA en la oscuridad a 35°C después de 72 h.	Olor	Crecimiento sobre PDA a 40 °C.
CCECH-Pasaje Hcda. Pio IV	<i>T. harzianum</i>	42.7-49.1 mm	34.5 - 41.3 mm	27.7 – 35.0 mm	ningún olor distintivo	No crece
CCECH-TJM Hcda. Grupo Marún	<i>T. koningii</i>	33-45-52 mm	4.5 mm	No crece	ningún olor distintivo	No crece
CCECH-M11 Hcda. Lilita	<i>T. pseudokoningii</i>	55 a 65 mm	55 a 65 mm	No crece	ningún olor distintivo	(5 – 10) (40 -55)mm
CCECH-Tung Hcda. Kimberly	<i>T. viride</i>	15-25 mm	No crece	No crece	Dulce a coco o ningún olor distintivo	No crece
CCECH-M18 La Izquierda	<i>T. harzianum</i>	42.7-49.1 mm	34.5 - 41.3 mm	27.7 – 35.0 mm	ningún olor distintivo	No crece
CCECH-Ju13 Carretera	<i>T. longibrachiatum</i>	65-70 mm	40-45 mm	No crece	ningún olor distintivo	13 - 44 -70 mm
CCECH-Ju27 Hcda. Los Ángeles	<i>T. viride</i>	15-25 mm	No crece	No crece	Dulce a coco o ningún olor distintivo	No crece
CCECH-T5 Agrícola El Rosario	<i>T. Pseudokoningii</i>	55 a 65 mm	55 a 65 mm	No crece	ningún olor distintivo	(5 – 10) (40 -55)mm
CCECH-THSL	<i>T. Pseudokoningii</i>	55 a 65 mm	55 a 65 mm	No crece	ningún olor distintivo	(5 – 10) (40 -55)mm

San Lorenzo						
CCECH-Ca36-3 Hcda.Agrícola del Pacífico	<i>T. harzianum</i>	42.7-49.1 mm	34.5 - 41.3 mm	27.7 – 35.0 mm	ningún olor distintivo	No crece

Fuente: Valeria Flores

Anexo F: Características de las ascosporas de 10 cepas de *Trichoderma* spp.

CÓDIGO Y SITIO DE RECOLECCIÓN	ESPECIE	ASCOSPORAS					
		Forma	Color	Distal longitud parcial ascosporas	Anchura parcial ascosporas Distal	Proximal longitud parcial ascosporas	Proximal anchura parcial ascosporas
CCECH-Pasaje Hcda. Pio IV	<i>T. harzianum</i>	Cilíndrica y verrugosa	Verde	2.8-)3.3-4.1 (-4.8) µm	2.7-)2.8-3.8 (-4.7) µm	(2.9)-3.4-4.3 (-5.4) µm	(2.1-)2.7-3.7 (-4.6) µm
CCECH-TJM Hcda. Grupo Marún	<i>T. koningii</i>	subglobosa a cónica	Hialina	2.9-)3.8-5.2 (-6.0) µm	(2.5-)2.2-4.7 (-5.4) µm	(3.3-)4.0-5.4 (-6.5) µm	(2.2-)2.5-4.2 (-4.8) µm
CCECH-M11 Hcda. Lilita	<i>T. pseudokoningii</i>	Subglobosa a elipsoidal	Hialina	(2.8-)3.2-3.8 (-4.5) µm	(2.8-)3.0-3.5 (-4.5) µm	(2.8-)3.3-4.0 (-5.0) µm	(2.0-)2.7-3.5 (-4.5) µm
CCECH-Tung Hcda. Kimberly	<i>T. viride</i>	Cilíndricas	Hialina	2.9-)3.5-4.5 (-5.2) µm	2.6-)2.6-4.1 (-4.9) µm	(3.0-)3.6-4.7 (-5.7) µm	(2.1-)2.6-3.8 (-4.6) µm
CCECH-M18 La Izquierda	<i>T. harzianum</i>	Cilíndrica y verrugosa	Verde	2.8-)3.3-4.1 (-4.8) µm	2.7-)2.8-3.8 (-4.7) µm	(2.9)-3.4-4.3 (-5.4) µm	(2.1-)2.7-3.7 (-4.6) µm
CCECH-Ju13 Carretera	<i>T. longibrachiatum</i>	No conocido	No conocido	No conocido	No conocido	No conocido	No conocido
CCECH-Ju27 Hcda. Los Ángeles	<i>T. viride</i>	Cilíndricas	Hialina	2.9-)3.5-4.5 (-5.2) µm	2.6-)2.6-4.1 (-4.9) µm	(3.0-)3.6-4.7 (-5.7) µm	(2.1-)2.6-3.8 (-4.6) µm
CCECH-T5 Agrícola El Rosario	<i>T. Pseudokoningii</i>	Subglobosa a elipsoidal	Hialina	(2.8-)3.2-3.8 (-4.5) µm	(2.8-)3.0-3.5 (-4.5) µm	(2.8-)3.3-4.0 (-5.0) µm	(2.0-)2.7-3.5 (-4.5) µm

CCECH-THSL San Lorenzo	T. <i>Pseudokoningii</i>	Subglobosa a elipsoidal	Hialina	(2.8-)3.2-3.8 (-4.5) μm	(2.8-)3.0-3.5 (-4.5) μm	(2.8-)3.3-4.0 (-5.0) μm	(2.0-)2.7-3.5 (-4.5) μm
CCECH-Ca36-3 Hcda.Agrícola del Pacífico	<i>T. harzianum</i>	Cilíndrica y verrugosa	Verde	2.8-)3.3-4.1 (-4.8) μm	2.7-)2.8-3.8 (-4.7) μm	(2.9)-3.4-4.3 (-5.4) μm	(2.1-)2.7-3.7 (-4.6) μm

Fuente: Valeria Flores

Anexo G: Ritmo de Crecimiento Radial para *Trichoderma* en mm a las 24 y 48 horas.

Código	0 Horas			24 Horas			48 Horas		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
CCECH-Ca36-3	2,00	2,00	2,00	12,00	13,75	17,50	45,00	45,00	45,00
CCECH-Ju13	2,00	2,00	2,00	19,50	19,50	19,50	45,00	45,00	45,00
CCECH-Ju27	2,00	2,00	2,00	19,50	23,00	20,50	45,00	45,00	45,00
CCECH-M11	2,00	2,00	2,00	23,50	21,50	22,50	45,00	45,00	45,00
CCECH-M18	2,00	2,00	2,00	17,00	19,50	18,25	45,00	45,00	45,00
CCECH-T5	2,00	2,00	2,00	23,00	21,50	21,00	45,00	43,50	45,00
CCECH-THSL	2,00	2,00	2,00	25,75	25,00	24,00	45,00	44,00	44,50
CCECH-TJM	2,00	2,00	2,00	22,00	25,00	22,50	45,00	45,00	45,00
CCECH-Tpasaje	2,00	2,00	2,00	13,75	16,75	13,75	45,00	45,00	45,00
CCECH-Tung	2,00	2,00	2,00	24,00	22,67	23,00	45,00	44,00	44,50

Fuente: Valeria Flores

Anexo H: Antagonismo de Trichoderma Vs. Mycosphaerella fijiensis a las 24 horas.

<i>Trichoderma</i>				<i>Micosphaerella fijiensis</i>		
<i>Código Trichoderma</i>	R1	R2	R3	R1	R2	R3
CCECH-Ju27	20,67	17,66	18,66	2	2	2
CCECH-M11	18,66	19,33	18,66	2	2	2
CCECH-THSL	14,66	13,66	13,66	2	2	2
CCECH-TJM	14	15	16	2	2	2
CCECH-T5	12,66	13	12,66	2	2	2
CCECH-Pasaje	12,66	13,33	14,33	2	2	2
CCECH-Tung	19	15,33	17,33	2	2	2
CCECH-Ca 36-3	18,33	17,33	15,33	2	2	2
CCECH-M18	11,66	11,33	10	2	2	2
CCECH-Ju13	14,33	16,33	19,33	2	2	2

Anexo I: Antagonismo de Trichoderma Vs. Mycosphaerella fijiensis a las 48 horas.

<i>Trichoderma</i>				<i>Micosphaerella fijiensis</i>		
<i>Código Trichoderma</i>	R1	R2	R3	R1	R2	R3
CCECH-Ju27	44	41,33	45	6,66	11,67	10
CCECH-M11	40,66	48,66	42,39	14	12	12,33
CCECH-THSL	31	34	30,66	11,66	10,66	10
CCECH-TJM	40,33	44,66	43	9,33	12,66	10
CCECH-T5	40,66	46,66	40,33	9	11	9,66
CCECH-Pasaje	46,66	56,33	51,49	5	11,33	11
CCECH-Tung	45,61	42,66	44,33	11	13,33	9,33
CCECH-Ca 36-3	51,66	49,66	50,66	12,66	12	9,33
CCECH-M18	33,33	32,33	34	12,33	11,33	13
CCECH-Ju13	36,33	44,66	46	11,33	10	11

Anexo J: Antagonismo de *Trichoderma* Vs. *Mycosphaerella fijiensis* a las 72 horas.

<i>Trichoderma</i>				<i>Mycosphaerella fijiensis</i>		
Código <i>Trichoderma</i>	R1	R2	R3	R1	R2	R3
CCECH-Ju27	50,66	52,66	54,66	14,33	16	12,67
CCECH-M11	53,33	58,66	56	16,33	19	18,66
CCECH-THSL	47,66	43	45,33	21,33	20,66	20
CCECH-TJM	53,66	59	58,33	13,66	16	17
CCECH-T5	61,66	62,33	56	17,66	15	16,33
CCECH-Pasaje	65,33	61,66	63,33	13,33	10,33	11,33
CCECH-Tung	63,33	52,66	58	15,66	14,33	16
CCECH-Ca 36-3	64,33	63	63,5	17,33	18	16,66
CCECH-M18	49,66	44,33	42	18,33	16,67	18,66
CCECH-Ju13	54	59,33	55	18,33	15	18,33

Fuente: Valeria Flores

Anexo K: Antagonismo de *Trichoderma* vs. *Mycosphaerella fijiensis* a las 96 horas.

<i>Trichoderma</i>				<i>Mycosphaerella fijiensis</i>		
Código <i>Trichoderma</i>	R1	R2	R3	R1	R2	R3
CCECH-Ju27	59,66	60	60,66	15,49	17,33	13,66
CCECH-M11	59	58,66	57,67	16,33	19,33	19,66
CCECH-THSL	52	53	53	26	21,33	23,67
CCECH-TJM	56,33	59,66	61	15,66	17	18,33
CCECH-T5	62,33	64	62,33	18,33	15,33	17,66
CCECH-Pasaje	66,33	63,66	58,33	14	11	13
CCECH-Tung	67,33	58,33	60,66	16,66	15,33	16,33
CCECH-Ca 36-3	65,33	63,33	64	19,33	19	17
CCECH-M18	50	45,66	46,33	20,33	17	18,66
CCECH-Ju13	58,33	59,33	57	20,66	18	20,66

Fuente: Valeria Flores

Anexo L: Antagonismo de Trichoderma Vs. Mycosphaerella fijensis a las 120 horas.

<i>Trichoderma</i>				<i>Micosphaerella fijensis</i>		
Código <i>Trichoderma</i>	R1	R2	R3	R1	R2	R3
CCECH-Ju27	60	64	61,33	16,33	17,66	15
CCECH-M11	60,33	58,67	58,33	17,33	19,33	20,33
CCECH-THSL	57	53	55,66	26,67	22,33	24
CCECH-TJM	60,66	62	62,33	16,33	17,33	19
CCECH-T5	63,67	66	64	18,33	16,33	18
CCECH-Pasaje	66,67	64,66	59,33	15,33	11	14
CCECH-Tung	67,33	60,66	61,33	17,66	15,33	18,33
CCECH-Ca 36-3	66,33	64	65,33	20,33	20,33	19
CCECH-M18	50	50,66	51,33	21,67	18,33	20,33
CCECH-Ju13	61	61	59,33	21	21,33	21,66

Fuente: Valeria Flores

Anexo M: Recuento de esporas en la cámara de Neubauer del bioformulado líquido almacenado a 4°C

DÍA	BIOFORMULADO LÍQUIDO (UPC/ml)				UPC/ml	log
	R1	R2	R3	R4	X	
0	2.05 X 10 ⁹	2.15 X 10 ⁹	2.10 X 10 ⁹	2.10 X 10 ⁹	2.10 X 10 ⁹	9.32
3	2.25 X 10 ⁹	2.20 X 10 ⁹	2.20 X 10 ⁹	2.15 X 10 ⁹	2.20 X 10 ⁹	9.34
6	2.40 X 10 ⁹	2.35 X 10 ⁹	2.40 X 10 ⁹	2.45 X 10 ⁹	2.40 X 10 ⁹	9.38
9	2.55 X 10 ⁹	2.50 X 10 ⁹	2.60 X 10 ⁹	2.55 X 10 ⁹	2.55 X 10 ⁹	9.41
12	2.95 X 10 ⁹	2.90 X 10 ⁹	2.90 X 10 ⁹	2.85 X 10 ⁹	2.90 X 10 ⁹	9.46
15	3.00 X 10 ⁹	3.05 X 10 ⁹	3.05 X 10 ⁹	3.00 X 10 ⁹	3.03 X 10 ⁹	9.48
18	3.00 X 10 ⁹	2.95 X 10 ⁹	3.15 X 10 ⁹	2.95 X 10 ⁹	3.01 X 10 ⁹	9.48
21	3.00 X 10 ⁹	3.05 X 10 ⁹	3.05 X 10 ⁹	3.00 X 10 ⁹	3.03 X 10 ⁹	9.48
24	2.95 X 10 ⁹	3.00 X 10 ⁹	3.15 X 10 ⁹	2.95 X 10 ⁹	3.01 X 10 ⁹	9.48
27	3.00 X 10 ⁹	2.90 X 10 ⁹	2.95 X 10 ⁹	2.90 X 10 ⁹	2.94 X 10 ⁹	9.47
30	2.70 X 10 ⁹	2.75 X 10 ⁹	2.80 X 10 ⁹	2.75 X 10 ⁹	2.75 X 10 ⁹	9.44
45	2.25 X 10 ⁹	2.20 X 10 ⁹	2.20 X 10 ⁹	2.25 X 10 ⁹	2.23 X 10 ⁹	9.35
60	1.45 X 10 ⁹	1.40 X 10 ⁹	1.45 X 10 ⁹	1.45 X 10 ⁹	1.44 X 10 ⁹	9.16

Fuente: Valeria Flores