

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERIAS

**Caracterización molecular y de patogenicidad de
Colletotrichum spp, en bananas var Cavendish y pruebas de
antagonismo con *Trichoderma* spp., recolectadas en fincas
bananeras de la región costa del Ecuador.**

Trabajo de investigación

Natalia Jacqueline Riera Villalba

Ingeniería en Agroempresa

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título
de

Ingeniera en Agroempresa

Quito, 20 de agosto de 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS DE LA SALUD

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Caracterización molecular y de patogenicidad de *Colletotrichum* sp. en bananas var Cavendish y pruebas de antagonismo con *Trichoderma* spp., recolectadas en fincas bananeras de la región costa del Ecuador

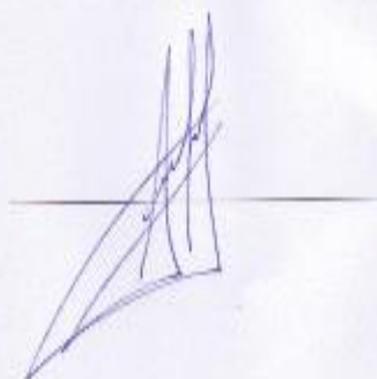
NATALIA JACQUELINE RIERA VILLALBA

Calificación: C

Nombre del profesor, Título académico

ANTONIO LEON-REYES, PhD

Firma del profesor



DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Natalia Jacqueline Riera Villalba

Código: 101130

C.I.: 1721838140

Lugar y fecha: Quito, agosto de 2015

RESUMEN

Las cepas de *Trichoderma* se caracterizan por interactuar en la rizósfera con determinados hongos fitopatógenos, endófitos y plantas. Este género de hongos *Trichoderma*, destaca por su efecto antagonístico contra un gran número de fitopatógenos que afectan a la producción agrícola, esto es posible ya que estos hongos poseen varios mecanismos de acción tales como: micoparasitismo, inducción de autodefensa vegetal, antibiosis y competencia por nutrientes. El propósito de este estudio fue aislar e identificar molecularmente los fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola* que causan antracnosis en banana var. Cavendish usando las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S. Además, se evaluó el efecto antagonístico de las cepas de *Trichoderma* aisladas de la región costa del Ecuador, frente a este fitopatógeno. Se analizaron 30 muestras de hojas de banano provenientes de bananeras de la región costa del Ecuador, estas muestras fueron sembradas en Medio Potatoe Dextrosa Agar (PDA) para el aislamiento y caracterización molecular de *C. gloeosporioides* y *C. fruticola*. De igual manera, fueron analizadas 30 muestras de suelo provenientes de bananeras de la región costa del Ecuador las cuales se sembraron en un Medio Selectivo para *Trichoderma* (TSM) para el aislamiento, ejecución de los ensayos duales y finalmente, su caracterización funcional. Se obtuvo 11 cepas de *Trichoderma*, de las cuales 5 pertenece a la provincia del Guayas, 2 cepas son de Los Ríos y 4 son de la provincia del Cañar. Al evaluar la patogenicidad causada por *C. gloeosporioides* y *C. fruticola* se observó que esta enfermedad es más agresiva cuando la banana empieza a madurar; acelera el proceso de deterioro y vida en percha. Por otro lado, el antagonismo directo y el efecto de los filtrados fúngicos de las cepas de *Trichoderma*, presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* y *C. fruticola*, en un 50% a 80% de inhibición. La cepa C3.4LT de *Trichoderma* spp., exhibió los dos mecanismos inhibitorios, es decir, elementos fungistáticos y agresividad en competencia. Finalmente, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren la utilización de las cepas de *Trichoderma* aisladas como agentes antagonistas para el control de la antracnosis en banana causada por los fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *C. fruticola*.

Palabras clave: *Colletotrichum* spp, *Trichoderma* spp, antracnosis, antagonista, banano.

ABSTRACT

Trichoderma strains are known to interact in the rhizosphere phytopathogenic fungi, endophyte fungi and certain plants. This genus of antagonistic fungus controls several phytopathogens that difficults the agricultural production, this could be due to several mechanisms of action such as: mycoparasitism, induction of plant self-defense, antibiosis and nutrient competition. The purpose of this study was too isolated and molecular characterization of the ITS regions of the ribosomal DNA 5.8S. Furthermore, the antagonistic properties of the isolated strains from the cost region of Ecuador of *Trichoderma* were tested against these phytopathogens. Thirty samples of banana leaves were analyzed from banana crops situated by the cost region of Ecuador. These samples were seeded on Potatoe Dextrosa Agar (PDA) for the isolation and molecular characterization of *C. gloeosporioides* and *C. fruticola*. Likewise, thirty samples of soils were analyzed from banana crops situated by the cost region of Ecuador, these samples were seeded on *Trichoderma* selective medium (TSM) for the isolation, for subsequent tests and finally, for its functional characterization. Eleven strains of *Trichoderma* were obtained, five of them were isolated from the province of Guayas, two were isolated from the province of Los Ríos and four from the province of Cañar. During the evaluation of pathogenicity caused by *C. gloeosporioides* y *C. fruticola*, seemed that this disease is more aggressive when the fruit begins to ripen, accelerating the deterioration process and life consumption. At the moment of evaluating the direct antagonism and the effect of the fungal filtrates, *Trichoderma* strains inhibition effect was determined on the growth of *C. gloeosporioides* and *C. fruticola*, between 50 and 80%. C3.4LT *Trichoderma* strain showed both antagonistic mechanisms, it presented fungal substances and great aggressiveness during competition. Finally, in this research findings suggest the use of *Trichoderma* strains as antagonists for the control of anthracnose in bananas caused by the phytopathogens *C. gloeosporioides* and *C. fruticola*.

Key words: *Colletotrichum* spp, *Trichoderma* spp, anthracnose, antagonist, banana

INDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	12
1.1 Musa sp:	12
1.2 Musa sp, var Cavendish.....	13
1.3 Problemas en el cultivo del banano	14
1.3.1.1 Generalidades del género <i>Colletotrichum</i> spp.....	15
1.3.1.2 Morfología de <i>Colletotrichum</i> spp.	16
1.3.1.3 Infecciones causadas por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum frutícola</i> en frutos de banano.	18
1.4 Determinación y caracterización molecular de microorganismos	19
1.5 Métodos de manejo de enfermedades en plantas	21
1.5.1. Manejo Integrado de Plagas (MIP).....	21
1.5.2. Control biológico de plagas en las plantas.	21
1.6 Generalidades <i>Trichoderma</i> spp.....	22
A. Micoparasitismo	25
B. Antibiosis	26
C. Competencia	27
D. Inducción de resistencia sistémica en plantas.....	27
1.7 Objetivo general	28
1.8 Objetivos específicos.....	28
1.9 Sistema de Hipótesis	28
1.10 Justificación del Problema:	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1 Zona de Estudio.....	31
2.2 Aislamiento de <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. frutícola</i>	31
2.3 Identificación molecular de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum frutícola</i>	32
2.3.1. Amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s por la técnica PCR.....	34
2.3.2. Purificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S amplificadas.....	35
2.3.3. Secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S amplificadas.	35
2.4 Prueba de patogenicidad de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum frutícola</i> en bananas var. Cavendish en diferentes grados de maduración.....	35
2.5 Aislamiento de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	37

2.6	Purificación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	38
2.7	Crio conservación de cepas de <i>Trichoderma</i> spp., <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. frutícola</i>	38
2.8	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antagónico de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp., sobre el crecimiento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum fruticola</i>	39
2.9	Valoración de filtrados fúngicos de cepas de <i>Trichoderma</i> spp., sobre el crecimiento <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum fruticola</i>	40
	RESULTADOS	42
3.1	Aislamiento e identificación funcional de cepas de <i>Trichoderma</i> a partir de muestras de suelos recolectadas en diferentes bananeras de la costa del Ecuador.....	42
3.2	Aislamiento e identificación morfológica de fitopatógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum fruticola</i>	45
3.3	Caracterización molecular de <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. frutícola</i>	46
3.3.1.	Amplificaciones de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S.	47
3.3.2.	Secuenciación y análisis de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S.....	48
3.4	Infección de <i>C. gloeosporioides</i> en diferentes grados de maduración de banana var. Cavendish	50
3.5	Infección de <i>C. fruticola</i> en diferentes grados de maduración de banana var. Cavendish	53
3.6	Caracterización funcional de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	57
3.6.1	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de antagónico de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp., sobre el crecimiento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	57
3.6.2	Evaluación de filtrados fúngicos de <i>Trichoderma</i> spp., sobre el crecimiento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	61
3.6.3	Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de antagónico de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp, sobre el crecimiento de <i>Colletotrichum frutícola</i>	64
3.6.4	Evaluación de filtrados fúngicos de <i>Trichoderma</i> spp., sobre el crecimiento de <i>Colletotrichum fruticola</i>	68
	DISCUSIÓN.....	71
	CONCLUSIONES	76
	RECOMENDACIONES	78
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	ANEXOS.....	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de las regiones estudiadas del ADN ribosomal y los diferentes cebadores (Solé, 2002).....	20
Figura 2: Fotografía macroscópica (A) y microscópica 100X (B) de la cepa de <i>Trichoderma</i> EA aislada de suelos recolectados de una bananera en El Empalme en la provincia del Guayas (Riera, 2015).....	24
Figura 3: Fotografía macroscópica (A) y microscópica 100X (B) de la cepa de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislada de hojas recolectadas en una bananera en la provincia de Los Ríos (Riera, 2015).....	32
Figura 4: Fotografía macroscópica (A) y microscópica 100X (B) de la cepa de <i>Colletotrichum fruticola</i> aislada de hojas recolectadas en una finca bananera Megaunión en la provincia de Los Ríos (Riera, 2015).	32
Figura 5: Escala de Von Loesecke para medir la maduración de banano (Ramírez et al., 2011).....	37
Figura 6: Fotografía de cultivos duales. (A) <i>C. gloeosporioides</i> y (B) <i>Trichoderma</i> spp., L2.4SJ (Riera, 2015).....	39
Figura 7: Fotografía de cultivos duales. (A) <i>C. fruticola</i> y (B) <i>Trichoderma</i> spp., LR 2.4 SJ (Riera, 2015).....	40
Figura 8: Evaluación de filtrados de cepas. A) Control <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> + PDA, B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> + 40% antibiótico de <i>Trichoderma</i> spp., LR 2.4.2 SJ (Riera, 2015).	41
Figura 9: Evaluación de filtrados de cepas. A) Control <i>Colletotrichum fruticola</i> + PDA, B) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> + 40% antibiótico de <i>Trichoderma</i> spp., LR2.4.2SJ (Riera, 2015).	41
Figura 10: Fotografía de la cepa de <i>Trichoderma</i> C3.2LT aislada de La troncal, Cañar. A) Macroscópica, césped miceliar aplanado en forma de anillos B) Microscópica 100X conidióforos en forma piramidal y ramificados.	43
Figura 11: Fotografías macroscópicas de las cepas de <i>Trichoderma</i> : A) GAB Bucay; B) G2AB Bucay; C) GSNB Bucay; D) GAEE El Empalme; E) GBEE El Empalme; F) C3.2LT La Troncal; G) C3.3LT La Troncal; H) C3.4LT La Troncal; I) C3.5LT La Troncal; J) LR2.4 San Juan; K) LR2.4.2 San Juan	44

Figura 12: Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. A) Crecimiento de patógeno directamente de explante de hoja, B) Cepa de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> purificada. C) Cepa de <i>Colletotrichum frutícola</i> purificada.	45
Figura 13: Identificación microscópica de A) <i>C. gloeosporioides</i> B) <i>C. frutícola</i> (Riera, 2015).....	46
Figura 14: Gel de agarosa al 2%, visualización de presencia de ADN genómico obtenida del fitopatógeno aislado de fincas bananeras localizadas en la provincia de Los Ríos: Megaunión (MD), Producvista (PA, PC, PD), Los Ríos (LR) (Riera, 2015).....	46
Figura 15: ADN amplificado, alrededor de 600 bp. 1) Marcador Molecular; posillos 2, 3, 4) Producvista A; posillos 5,6) Producvista C, posillos 7, 8) Producvista D, posillos 9, 10, 11, 12) Los Ríos, posillos13, 14) Megaunión D. (Riera, 2015)	47
Figura 16: Fragmento de un electroferograma de la región ITS4 del ADN ribosomal 5.8S del fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> desde 250pb hasta 350pb (Riera, 2015).	48
Figura 17: Fragmento de un electroferograma de la región ITS4 del ADN ribosomal 5.8S del fitopatógeno <i>C. fruticola</i> desde 250pb hasta 350pb (Riera, 2015).....	48
Figura 18: Resultado de la identificación los fitopatógeno según la base bioinformática Gen Bank del NCBI, usando BLAST. A) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . B) <i>Colletotrichum fruticola</i> (Blast, 2015).	49
Figura 19: Análisis de patogenicidad de <i>C. gloeosporioides</i> . A) Control día 3, B) Control día 9, C) Control día 17 (Riera, 2015).....	51
Figura 20: Análisis de patogenicidad de <i>C. gloeosporioides</i> . A) Daños día 3, B) Daños día 7, C) Daños día 14, D) Daños día 17 (Riera, 2015).....	51
Figura 21: Análisis de patogenicidad de <i>C. gloeosporioides</i> . Crecimiento diario en mm del patógeno en cada grado de maduración de bananas durante diecisiete días.....	52
Figura 22: Diámetro de crecimiento de las lesiones (mm, día 17) en frutos de banana en diferentes grados de maduración.	53
Figura 23: Análisis de patogenicidad de <i>C.fruticola</i> . A) Control día 3, B) Control día 9, C) Control día 17 (Riera, 2015).....	54
Figura 24: Análisis de patogenicidad de <i>C. fruticola</i> . A) Daños día 2, B) Daños día 7, C) Daños día 13, D) Daños día 17	54
Figura 25: Análisis de patogenicidad de <i>C. fruticola</i> . Crecimiento diario del patógeno en cada grado de maduración de bananas durante diecisiete días	55
Figura 26: Gráfica del porcentaje de infección promedio de <i>C. fruticola</i> en frutos de bananas	56

Figura 27: Cultivos duales A) Control <i>C. gloeosporioides</i> , B) Prueba de competencia, C) Control de cepa de <i>Trichoderma</i> spp., LR2.4.2SJ (Riera, 2015)	57
Figura 28: Gráfica del efecto antagónico mediante la prueba de competencia con las cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas de suelos de bananeras de la costa del Ecuador.	58
Figura 29: Antibiosis de la cepa de <i>Trichoderma</i> C3.4LT sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Riera, 2015).....	61
Figura 30: Evaluación de Filtrados de cepas A) <i>Trichoderma</i> spp., G2AB	62
Figura 31: Gráfica del efecto antagónico mediante la prueba de antibiosis con las cepas de <i>Trichoderma</i> spp, aisladas de suelos de bananeras de la costa del Ecuador.....	63
Figura 32: Cultivos duales A) Control <i>C. fruticola</i> , B) Prueba de competencia, C) Control de cepa de <i>Trichoderma</i> spp., LR2.4.2SJ.....	65
Figura 33: Gráfica del efecto antagónico mediante prueba de competencia con las cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas de suelos de bananeras de la costa del Ecuador.	66
Figura 34: Análisis de antibiosis. A) Control del crecimiento de <i>C. frutícola</i> en medio PDA. B) Crecimiento de <i>C. frutícola</i> en medio PDA + 40% de metabolitos producidos por la <i>Trichoderma</i> spp., LR2.4SJ.....	68
Figura 35: Gráfica del efecto antagónico mediante la prueba de antibiosis con las cepas de <i>Trichoderma</i> spp, aisladas de suelos de bananeras de la costa del Ecuador.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>C. gloeosporioides</i>	17
Tabla 2: Clasificación taxonómica de <i>C. fruticola</i>	17
Tabla 3: Primes universales utilizados en esta investigación (Muñoz, 2012).	20
Tabla 4: Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i> spp	25
Tabla 5: Sitios de donde se enviaron las muestras de suelo y hojas.....	31
Tabla 6: Programa de PCR para la amplificación de las regiones ITS de hongos (Muñoz, 2012).....	34
Tabla 7: Protocolo empleado para la PCR de las regiones ITS del ARN ribosomal 5.8s de hongos (Muñoz, 2012).....	34
Tabla 8: Cepas de <i>Trichoderma</i> spp, aisladas de diferentes fincas bananeras del Ecuador.....	42
Tabla 9: Aislados de <i>Colletotrichum</i> spp	50
Tabla 10: Valores p de significancia para cada comparación de tratamientos.....	53
Tabla 11: Valores p de significancia para cada comparación de tratamientos.....	56
Tabla 12: Valoración de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	59
Tabla 13: Evaluación del efecto antagónico de las cepas <i>Trichoderma</i> spp., frente a <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	60
Tabla 14: Valoración de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	63
Tabla 15: Evaluación del crecimiento de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , bajo el efecto de los filtrados fúngicos de las cepas <i>Trichoderma</i> spp.	64
Tabla 16: Valoración de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	67
Tabla 17: Evaluación del efecto antagónico de las cepas <i>Trichoderma</i> spp., frente a <i>Colletotrichum fruticola</i>	67
Tabla 18: Valoración de cepas de <i>Trichoderma</i> spp	69
Tabla 19: Evaluación del crecimiento de <i>Colletotrichum fruticola</i> , bajo el efecto de los filtrados fúngicos de las cepas <i>Trichoderma</i> spp.....	70

INTRODUCCIÓN

1.1 *Musa* sp:

El banano, *Musa* sp, pertenece a la familia de las musáceas originadas de más de una especie silvestre. Se ha determinado que el banano se originó de una serie de mutaciones a partir de especies silvestres, principalmente *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, dos especies diploides con semillas (De La Torre, 2011). Las especies comerciales son triploides (AAA bananos comerciales, AAB plátanos), en los cuales el progenitor hembra contribuye con dos grupos de cromosomas y el padre con uno. Geográficamente, estas musáceas son originarias del sureste asiático y del Archipiélago Malayo (De La Torre, 2011). Las regiones con mayor producción de banano son la India, China, Filipinas, Ecuador y Brasil (FAOSTAT, 2013).

El banano es propio de regiones tropicales donde la temperatura adecuada esta entre los 18,5° C y 35,5° C (Fagian & Tapia, 2013). A nivel comercial se adaptan hasta los 300m de altitud, sin embargo, algunos cultivos producen en altitudes de hasta 2 300m. Este cultivo exige suelos profundos con una buena fertilidad, altos niveles de materia orgánica y buen drenaje; el pH del suelo varía entre 4.5 a 7.5 y requiere precipitaciones de 1000 a 2000mm/año (De La Torre, 2011). *Musa* sp, se caracteriza por tener aspecto de árbol, pero en realidad es una herbácea perenne gigante con tallos subterráneos formados por las bases foliares a manera de vainas. Sus hojas miden de 1.5 a 3 m de largo y 0.30 a 0.60 m de ancho con peciolo envainados, semicilíndricos; las flores consisten en una inflorescencia terminal sobre un eje central en donde se insertan numerosas brácteas en forma de espiral que da origen al racimo. Un racimo puede tener de 5 a 20 manos, cada una con 2 a 20 frutos (Córdova, 2010). El tallo verdadero es un rizoma gigante almidonoso, subterráneo, coronado con yemas. El rizoma se origina de una yema vegetativa que emerge de la planta madre, la misma que se diferencia dando lugar a brotes los mismos que se convertirán en "hijos" (De La Torre, 2011).

Gracias a varios estudios y ensayos en campo se ha seleccionado la variedad de banano Cavendish para la comercialización en Ecuador, debido a su alta resistencia a enfermedades severas que atacan a este cultivo, como es el mal de panamá (Sotomayor, 2010).

1.2 *Musa sp, var Cavendish*

Su nombre común es banano, la variedad Cavendish es la principal variedad exportada por Ecuador debido a que esta presenta mayor resistencia a las diferentes plagas que afectan a este cultivo. Esta variedad proviene de Vietnam, China y las Islas Canarias y es conocida por ser grande y robusta. A nivel mundial se producen alrededor de 78,8 millones de toneladas de banano de las cuales 16,3 millones se exportan a Estados Unidos, Alemania, Bélgica y Japón (Balcazar, 2014).

El banano es una de las frutas con mayor contenido de potasio, siendo este hasta de un 23%. Se ha comprobado que el potasio beneficia a los músculos evitando los espasmos musculares, también se ha mencionado su potencial en prevención de enfermedades cerebrovasculares y disminuye la presión arterial. En adición, el banano es una fruta rica en vitaminas A, B₆, C y D, ayudando a los huesos y músculos del cuerpo. Otra importancia del banano es su porcentaje de almidón (70%) en su estado inmaduro, el almidón es un polímero natural muy utilizado en la industria de alimentos (Blasco & Gómez, 2014)

Principalmente se propaga de forma vegetativa la cual se utiliza para producir una planta que contenga el mismo genotipo de la planta madre y esto es posible porque todas las células de una planta poseen la información suficiente para originar una planta entera (Canchignia, 2008). Las ventajas de esto es una producción relativamente uniforme, también la preservación del sabor y propiedades nutraceuticas, mientras que las desventajas de la propagación vegetal es la pérdida de la resistencia a plagas de plantas utilizadas como material de siembra. Las plagas pueden crear mutaciones que sobrepase la resistencia de las variedades sembradas, esto se debe por la falta de ciclos de reproducción sexual (Canchignia, 2008). Además, las variedades de banano resistentes a plagas solo exhibirán resultados frente a plagas específicas, sin embargo, existen otras enfermedades que atacan al cultivo del banano y generan pérdidas en la producción y comercialización.

1.2.1 Situación del banano en el Ecuador.

Se lo cultiva en las provincias del Guayas, Los Ríos, El Oro, Cañar, Esmeraldas, Manabí, Pichincha, Cotopaxi, Azuay y Bolívar (INEC, 2012), donde se lo comercializa tanto como fruta madura y verde. El consumo de banano se da a nivel nacional dentro de todo el país y constituye como alimento esencial de la dieta diaria de adultos y niños.

Uno de los cultivos de más importante para la económica en el Ecuador son las frutas, en especial el banano. Ecuador es el cuarto productor mundial, produciendo 6, 503, 885.50M toneladas de banano al año (FAOSTAT, 2013), generando \$ 1900 millones de dólares en ingresos de divisas, y otros \$ 90 millones de dólares por concepto de impuestos al estado. Además, los ingresos generados por la actividad bananera representan el 3,84 % del PIB total, el 50 % del PIB agrícola y el 20 % de las exportaciones privadas del país. En cuanto al mercado del banano ecuatoriano, este es bastante diversificado, los países de destino a exportación de la fruta constituyen: Unión Europea 42%, USA 21%, Rusia 20%, Cono Sur 6% y el 11% restante se destina a mercados marginales: Medio Oriente, Europa del Este, África del Norte y Asia (Sotomayor, 2010).

El precio de la caja de banano para exportación ha sido fijado en \$6,55 para el año 2015. Este acuerdo contempla temas como los precios de acuerdo a los tipos de caja y de fruta, el peso de la caja, los precios mínimos de sustentación, y los compromisos de los sectores productivo y exportador que permitan mejorar la productividad y reducir los costos de producción (MAGAP, 2015).

1.3 Problemas en el cultivo del banano

El banano en especial, es un fruto nutritivo rico en vitaminas y minerales, contiene altas cantidades de potasio, magnesio, calcio, fósforo y hierro (ProEcuador, 2015). Además, es un rubro importante para el país, sin embargo, la producción se ve afectada por enfermedades que atacan a esta planta, entre estas están: moko del plátano (causado por bacterias), *Erwinia*, mal de panamá, sigatoka negra, antracnosis (infección por hongos), nemátodos, entre otras (Agrocalidad, 2013).

1.3.1 Infecciones causadas por hongos

Las infecciones causadas por hongos en plantas están relacionadas con pérdidas en la producción y comercialización agrícola. Su actividad se incrementa en épocas de invierno en donde las precipitaciones son mayores (Verdu, 1986). Provocan grandes daños en los cultivos puesto que reducen su vigor lo cual se observa en el rendimiento de la planta. El banano es un frutal el cual se ve afectado por hongos tanto en sus hojas, rizoma y raíces causando hasta la muerte de la planta.

Los agentes que causan enfermedades en las plantas se caracterizan por ser infecciosos (agentes bióticos) entre los cuales se clasifican en hongos, bacterias, virus. En especial, los hongos son organismos filamentosos simples, no contienen clorofila lo cual los hace dependientes de una planta hospedera para conseguir su alimento. Estos agentes son más grandes que las bacterias lo cual facilita su identificación. Los hongos atacan a las plantas a través de sus estructuras reproductivas (esclerocios y esporas), las cuales colonizan a su hospedero ya sea en forma mecánica, mediante el viento y agua. En adición, las infecciones causadas por hongos se diseminan con facilidad mediante suelos contaminados (Almodóvar, 1996).

Un mecanismo que utilizan los hongos para penetrar y colonizar el tejido vegetal de la planta hospedera consiste en la excreción, por parte del hongo, de enzimas tales como cutinasas y esterases que alteran la superficie vegetal facilitando la adherencia lo cual ayuda a que las hifas del hongo entren en el tejido de la planta (Rivera & Codina, 2000). Entre los hongos patógenos que afectan al banano y causan grandes pérdidas están: mal de panamá (*Fusarium oxisporum* f.sp. cubense), sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y, un nuevo reporte, antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum frutícola*).

1.3.1.1 Generalidades del género *Colletotrichum* spp.

Los hongos del género *Colletotrichum*, son de una distribución cosmopolita, pero predomina en los trópicos y subtropicos (Rodríguez et al., 2009). Las condiciones climáticas óptimas para su desarrollo son lluvias intensas y fuertes con una humedad relativa alta (Castro et al., 2003). *Colletotrichum* abarca numerosas especies las cuales

están clasificadas en base a la planta hospedera y características (Beltrán & Jaramillo, 2006). Este patógeno puede afectar un gran número de frutas, en grados de maduración tanto verde como en la fruta madura, óptima para consumir, entre estos se encuentra: guanábana, cítricos, mango, tomate de árbol, mora, manzana, papaya, aguacate, banana, etc (Chumimarca, 2004). Al inicio, la sintomatología se presenta con lesiones las cuales con el paso del tiempo y evolución de la enfermedad causan una necrosis total de las hojas. La enfermedad propagada por este hongo es conocida comúnmente como antracnosis o infección latente, posee una habilidad natural para infectar a raíz, tallo, hojas, flores y fruto (Beltrán & García, 2006).

La sintomatología que resulta del ataque de este hongo cambia de acuerdo al órgano de la planta afectado. Por ejemplo, los síntomas de antracnosis en frutos se manifiestan generalmente en forma de manchas circulares, hundidas, con círculos concéntricos de color anaranjado, especialmente se presenta en estados de desarrollo del fruto, también en etapas cercanas a la maduración (OIRSA, 2003). Adicionalmente, el clima perfecto para el desarrollo y germinación de conidios de este hongo son en temperaturas y alta humedad, así los conidios son liberados y se diseminan a través de la lluvia y el viento (OIRSA, 2003).

Entre las especies causantes de antracnosis en frutales se encuentran: *C. gloeosporioides*., *C. musae*., *C. acutatum* *C. fruticola*., *C. asianum*, *C. dianersei*, *C. karstii* (Pérez et al., 2001, Lima et al., 2014). Estas especies han sido reportadas como un problema de poscosecha de varios frutales como son: papaya, mango, banana, uva, manzana, aguacate, guayaba, entre otros. De esta manera, las infecciones generadas por *Colletotrichum* spp., causan grandes pérdidas económicas para el productor (Salazar et al., 2012). Entre las especies con un amplio antecedente de daños en banano se reporta a *Colletotrichum gloeosporioides* (fase anamórfica, asexual o imperfecta) o *Glomerella cingulata* (fase teleomórfica, sexual o perfecta), en donde, la fase sexual otorga la variabilidad genética, mientras que la fase asexual se encarga de la dispersión de esta enfermedad.

1.3.1.2 Morfología de *Colletotrichum* spp.

A nivel macroscópico, el hongo generalmente, tiene un crecimiento lento *in vitro* y sus colonias poseen una coloración que va desde gris claro hasta gris oscuro, a pesar

de que en un medio de agar con avena éste puede presentar colonias de color blancas, poco algodonosas y masas conideales anaranjadas. En cuanto a nivel microscópico, éste presenta hifas septadas y produce apresorios clavados, ovalados, a veces lobulados y de coloración café; sus conidios son hialinos que varían de tamaño y muestran una forma cilíndrica y obtusa en el ápice. La temperatura óptima para su crecimiento es de 27°C con una alta humedad relativa de 80-100% (Rodríguez y otros, 2009).

Su taxonomía se presenta en la tabla 1 y 2:

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *C. gloeosporioides*

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Sordariomycetes insertae cedis
Orden	Phyllachorales
Familia	Phyllachoraceae
Género	<i>Colletotrichum</i>
Especie	<i>gloeosporioides</i>

Fuente: Wikipedia, 2015

Tabla 2: Clasificación taxonómica de *C. fruticola*

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Sordariomycetes insertae cedis
Orden	Phyllachorales
Familia	Phyllachoraceae
Género	<i>Colletotrichum</i>
Especie	<i>fruticola</i>

Fuente: Wikipedia, 2015

1.3.1.3 *Infecciones causadas por Colletotrichum gloeosporioides y Colletotrichum frutícola en frutos de banano.*

Los fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *C. fruticola* son agentes causales de antracnosis en diferentes especies de frutas y vegetales a nivel mundial. La antracnosis puede atacar tanto a cultivos durante su fase de desarrollo, es decir, su fase de campo, pero afecta con mayor severidad al producto final durante el almacenamiento y comercialización. Es así, que genera grandes pérdidas tanto en su sistema de manejo químico en campo y poscosecha, disminuye la oportunidad de venta de la fruta debido a la baja calidad del producto afectado.

La enfermedad conocida como antracnosis, se ha reportado en el banano y es causada por especies de hongos del género *Colletotrichum* spp, (Intan & Suzianti, 2013). En Malasia, el banano cultivado con fines de comercialización interna y exportación a incurrido en pérdidas inminentes debido al ataque de antracnosis causada por *C. gloeosporioides*, especialmente a nivel de poscosecha (Intan & Suzianti, 2013). En este estudio, un 80% de la fruta fue infectada por *C. gloeosporioides* la cual perjudica a la calidad de la fruta, en dónde el ataque de esta enfermedad incrementa cuando el banano se encuentra en su fase de maduración.

En Costa Rica, también se ha reportado afecciones de antracnosis en banano. En ese estudio, 25 aislamientos de *Colletotrichum* spp, obtenidos de frutos de banano provenientes de diferentes zonas de Turrialba-Costa Rica, fueron utilizados para caracterizar molecularmente y evaluar al hongo. Los resultados del análisis molecular indicaron que los aislamientos correspondían a la especie de *Colletotrichum gloeosporioides* (Salazar et al., 2012).

Adicionalmente, en otro estudio en Malasia se aislaron a partir de bananas y otras frutas que presentaban síntomas de antracnosis diferentes especies de *Colletotrichum*. En total, trece aislados de *Colletotrichum* se obtuvieron de distintos cultivos de banana. Las especies de *Colletotrichum* son responsables de la antracnosis en banano y es una de las enfermedades más serias que afectan a esta fruta cuando madura (Zakaria et al., 2009).

Por otra parte, *C. frutícola* no ha generado reportes de infección en banana, sin embargo, se considera que de igual manera éste hongo podría ser un problema importante al causar antracnosis en bananas (Lima, 2014).

1.4 Determinación y caracterización molecular de microorganismos

Para una identificación rápida y confiable de cualquier organismo en general, se recurren a las técnicas moleculares; las cuales con ayuda de bases bioinformáticas nos proveen de información certera, permitiéndonos reconstruir la historia filogenética del individuo. Existen numerosas técnicas moleculares para el estudio taxonómico de los hongos que permiten establecer similitud o no entre cepas morfológicamente similares (Ochoa & Suárez, 2008).

Las técnicas reportadas como las más importantes son los RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism Analysis), RAPD (Random Amplification of polymorphic DNA) y el método de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis); con ayuda de estas técnicas existen una serie de métodos que analizan el genoma completo para lograr una identificación de los organismos, desde el análisis del ADN mitocondrial, hasta el ADN nuclear; siendo los genes más estudiados los del ARN ribosomal (Ochoa & Suárez, 2008).

El ADN ribosómico pueden encontrarse en mitocondrias, cloroplasto y en el núcleo. La razón principal para el estudio del ADN ribosomal, es que es un gen multicopia que contiene regiones que no codifican para proteínas, y estas copias están repetidas en tándem, facilitando su amplificación (Calle, 2005).

Entre las secuencias altamente conservadas de los genes de esta región se encuentran unas regiones variables, denominados espaciadores o ITS (internal transcribed spacers), estas regiones tienen una alta tasa de variabilidad comparado con los genes, pero sus secuencias se pueden alinear entre taxones estrechamente relacionados (Insua et al., 2003). La región de ADN ribosómico incluye el gen 18S o SSU, el ITS1, el gen 5.8S, el ITS2 y el gen 28S o LSU. Las regiones que están relativamente conservadas entre los hongos son: 18S, 5.8S, y 28S, facilitando una base

molecular para buscar relaciones filogenéticas a diferentes niveles (fig 1) (Luna et al., 2001).

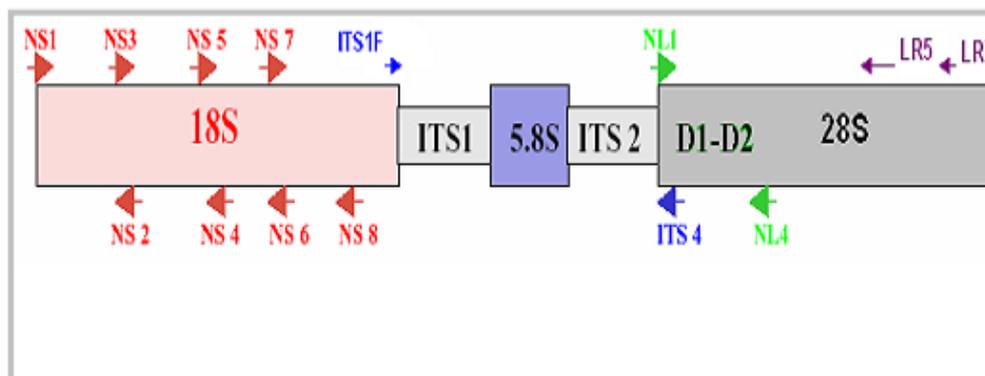


Figura 1: Representación esquemática de las regiones estudiadas del ADN ribosomal y los diferentes cebadores (Solé, 2002)

La región ITS completa constituye de 600 a 800pb, puede amplificarse fácilmente con cebadores universales (tabla 3), la naturaleza multicopia de estas repeticiones hace que esta región sea fácil de amplificar aunque existan pocas muestras de ADN, que se encuentren degradadas o muy diluidas (Ochoa & Suárez, 2008).

Tabla 3: Primes universales utilizados en esta investigación (Muñoz, 2012).

Primer	Secuencia
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS 4	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'

Secuenciación

El análisis más exhaustivo del ADN consiste en conocer la secuencia de nucleótidos en su estructura. Esto se lo logra a través de los métodos de secuenciación de ADN. Los más utilizados actualmente son el de secuenciación automática y el método de Sanger. El propósito de la secuenciación es determinar el orden de los nucleótidos de un gen, para lo cual se parte desde fragmentos de PCR o genes clonados. Hay tres pasos en la reacción de secuenciación, que se repiten por 30 o 40 ciclos (Gutiérrez, 2006).

La población de moléculas generada, se separa por tamaños mediante electroforesis en acrilamida y la secuencia se obtiene relacionando el orden de los fragmentos en la electroforesis con el didesoxinucleótido marcado fluorescentemente,

que termina cada uno de ellos. En secuenciación automática, la utilización de estas marcas permite detectar el ADN durante la electroforesis (González & Zavala, 2005).

1.5 Métodos de manejo de enfermedades en plantas

1.5.1. Manejo Integrado de Plagas (MIP).

La mayor parte de las pérdidas de productos agrícolas están vinculadas con el ataque de plagas y enfermedades. Este es un problema que sucede durante las etapas de pre y post-cosecha; además, la probabilidad de un ataque patogénico ha aumentado desde que se destinó grandes extensiones de tierra a un solo cultivo, modificando el equilibrio ecológico natural. Las labores culturales como la rotación de cultivos, poda, espacio entre planta son prácticas naturales que se vienen usando hace mucho tiempo y que han dado buenos resultados reduciendo la tasa de ataque de plagas y enfermedades (Arauz, 2009).

En la actualidad, las herramientas químicas han facilitado el control de las plagas y enfermedades, sin embargo su uso intensivo y hasta a veces desmedido, ha provocado consecuencias negativas sobre el ambiente, la salud del agricultor y del consumidor. Esto se debe a que estas sustancias químicas pueden acumularse en el suelo, agua y aire. Además, algunas poblaciones de plagas y patógenos durante su desarrollo evolutivo, han perdido la sensibilidad ante estos agentes químicos, creando una resistencia lo que resulta en una solución de corta plazo (Lamba et al., 2008). Por esta razón, es imperativo desarrollar otras alternativas menos dañinas para el ambiente y para la salud humana, Una de las herramientas dentro de este contexto es el control biológico.

1.5.2. Control biológico de plagas en las plantas.

La mayoría de enfermedades producidas por microorganismos patógenos en las plantas se atribuye a infecciones de hongos, bacterias y virus que ocasionan grandes pérdidas en la agricultura (Sánchez, 2009). En la agricultura, con el fin de terminar con estas enfermedades que afectan a los cultivos, se ha dado prioridad al control químico, el cual ha mostrado buenos resultados, sin embargo, solo recientemente se ha concientizado en los peligros que éstos representan. En la actualidad, se conoce de nuevas alternativas, denominadas como un control biológico, que cumplan con un

objetivo potencial en el manejo de enfermedades en los cultivos, las mismas que no figuren como perjudiciales o peligrosas para la salud humana y riesgo ambiental.

El control biológico es parte del Manejo Integrado de Plagas y se refiere al uso de medios biológicos: parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras con el objetivo de disminuir la población de plagas e infección enfermedades, haciendo de éstas menos abundantes (Sarayasi, 2012; Taveras, 2000). Entre los microorganismos más estudiados para el control de plagas se destacan las bacterias del género *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. subtilis*) *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, para el control de insectos, bacterias y hongos fitopatógenos; hongos entomopatógenos como *Lecanicillium* spp., *Bauveria bassiana*, *Bauveria brogniartii*, *Metarhizium*, *Isaria fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinus* y otros hongos de los géneros *Gliocadium*, *Streptomyces*, *Coniothyrium*, *Candida* y *Trichoderma* (Lamba et al., 2008).

En el reino Fungi existe el orden de los Ascomycetos en dónde se clasifican organismos de gran valor económico, éstos tienen gran potencial como controladores biológicos (productores de antibióticos y micotoxinas). Dentro de este orden se encuentra el género *Hypocrea* el cual se ha destacado como un agente para el control biológico el cual actúa sobre hongos patógenos de plantas e insectos. Adicionalmente, *Trichoderma* presenta un record de agresividad contra diversos hongos patógenos considerados plagas en la explotación agrícola (Romero y otros, 2009).

1.6 Generalidades *Trichoderma* spp

El género *Trichoderma* es un hongo cosmopolita, están adaptados a diferentes condiciones ambientales lo que facilita su distribución, siendo habitante natural de los suelos ricos en materia orgánica. Frecuentemente se encuentra sobre madera y tejidos vegetales en descomposición (Esparza, 2009). *Trichoderma* es un organismo dominante en la microflora de los suelos. El género *Trichoderma* engloba a un grupo importante de hongos filamentosos anamórficos (mitóticos - reproducción asexual), sin embargo, en algunos aislamientos se ha determinado el estado teleomórfico (meiótico – reproducción sexual) dentro del género *Hypocrea* (Harman et al., 1998). El estado

teleomórfico de *T. harzianum* corresponde a *Hypocrea lixii* (Dodd et al., 2002). Esta se lo atribuye a su diversa capacidad metabólica y su naturaleza agresiva para competir con el resto de microorganismos capaz de modificar la rizósfera (Schuster et al., 2010). El hongo *Trichoderma* posee un increíble sistema fisiológico, lo que le permite crecer en diversos sustratos empleado diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y energía (Harman et al., 1998).

Trichoderma es un hongo anaerobio facultativo, la temperatura ideal para su crecimiento lineal en agar y producción de micelio está entre 20° y 28° C, a pesar de que puede soportar temperaturas extremas entre 6° a 32° C. El contenido mínimo de humedad necesaria para su desarrollo vegetativo es de 92% y para su esporulación es del 93% a 95%; tiene una afinidad a la luz, en especial al azul y violeta ya que la luz promueve la formación de esporas, crecimiento del micelio y la coloración (Romero et al., 2009). Los suelos que presentan bajas condiciones de humedad, reducen el crecimiento de *Trichoderma* (Harman et al., 1998).

La habilidad de *Trichoderma* para reducir enfermedades causadas por hongos del suelo es bien conocida, y son muchos los mecanismos que están considerados importantes, entre ellos: la competencia por nutrientes (micoparasitismo), y la antibiosis con la producción de metabolitos secundarios y enzimas que son clave en la destrucción de fitopatógenos (Harman, 2006). Otro mecanismo de acción reportado, es la inducción de resistencia en las plantas enfatizando la producción de hormonas, peroxidasas, fitoalexinas y compuestos fenólicos (Osorio, 2010).

1.6.1 Morfología

En su estado temprano *Trichoderma* tiene un color miceliar blanco y eventualmente toma un color verde después de la esporulación que es fotosensible (Romero et al., 2009). Las cepas de *Trichoderma* al ser cultivadas en medio de cultivo PDA, crecen a partir de los días 4 o 5 a una temperatura de 25° C; las especies de este género prefieren un pH ácido de 4.5-5 (Fig. 2A). Microscópicamente podemos observar el patrón de distribución de los conidióforos en forma piramidal o cónica, erectos altamente ramificados (Fig. 2B) Están tabicados y sus células contienen más de un núcleo (Guigón et al., 2010).

Los conidios que se forman a partir de células conidiógenas enteroblásticas fialídicas se agrupan al final del conidióforo. Los conidios son ovoides, con pared lisa y un solo núcleo, su color es verde brillante; miden de 2.4 a 3.2 por 2.2 a 2.8 μm . Las hifas septadas forman una especie de césped miceliar aplanado y sólido (Harman et al., 1998).

En condiciones de estrés el hongo produce estructuras de resistencia denominadas clamidiosporas Intercaladas, éstas se forman sobre el micelio y presentan pared rugosa y más gruesa que los conidios, son de forma globosas a elipsoidales, hialinas. Miden en promedio 6.9 μm de diámetro (Harman et al., 1998).

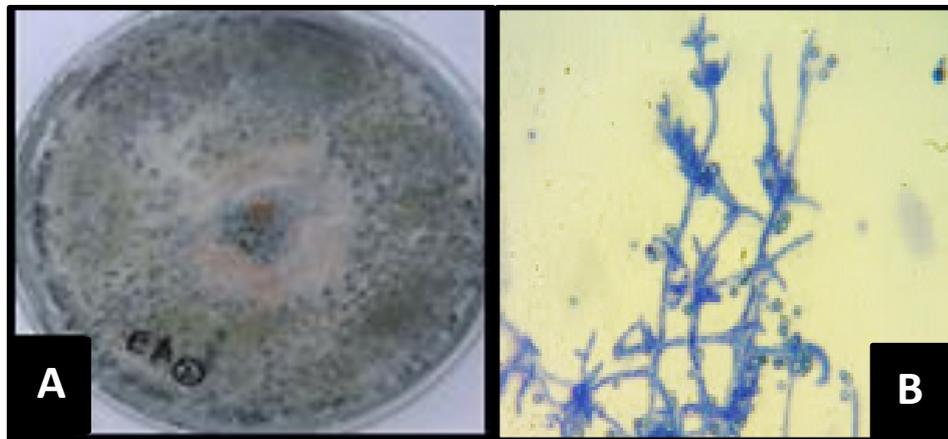


Figura 2: Fotografía macroscópica (A) y microscópica 100X (B) de la cepa de *Trichoderma* EA aislada de suelos recolectados de una bananera en El Empalme en la provincia del Guayas (Riera, 2015)

1.6.2 Sistemática

En la actualidad el género *Trichoderma* presenta un listado alrededor de 104 especies, divididas en 5 secciones en donde cada sección está dividida en varias colecciones, las secciones fundamentales son: *PACHYBASIUM*: (*T. harzianum* y *T. virens*), *TRICHODERMA* (*T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride.*) y *LONGIBRACHIATUM* (*T. longibrachiatum* y *T. saturnisporum*). Además *HYPOCREARUM* y linajes individuales (Muñoz, 2012). Las cepas de las dos primeras secciones son usadas como controladores biológicos, otras representan un riesgo a la

salud humana y ciertos cultivos de interés (Muñoz, 2012). La clasificación taxonómica del hongo *Trichoderma* se indica en la tabla 4.

Tabla 4: Clasificación taxonómica de *Trichoderma* spp

Super Reino:	Eucariota
Reino:	Fungi
Filum:	Ascomycotina
Subfilum:	Pezizomycotina
Clase:	Sordariomycetes
Subclase:	Hypocreomycetidae
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Género:	<i>Trichoderma</i>
Especie:	<i>koningii, harzianum, hamatum, longibrachiatum, entre otras.</i>

Fuente: NCBI, 2012.

1.6.3 Mecanismos de acción frente a patógenos

A. Micoparasitismo

El micoparasitismo se define como el uso que da *Trichoderma* al patógeno como alimento, en el que generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas que digieren las paredes de los hongos y de esta manera ocasiona su muerte (Hoyos et al., 2008). Cuando lo último ocurre se habla de micoparasitismo necrotrófico, a diferenciar del biotrófico, en el que se mantiene una relación con células vivas durante largos periodos de tiempo (Harman, 2006). Además, el micoparasitismo es un proceso complejo de quimiotrópico dónde las hifas de *Trichoderma* puede detectar a otra especie a la distancia y crecen en dirección al hospedante como respuesta a un estímulo químico, si se trata de un quimiotropismo positivo. Luego, *Trichoderma* se adhiere a las hifas del mismo, se enrollan en ellas y

posteriormente las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante genera el debilitamiento casi total del fitopatógeno (Infant et al., 2009).

B. Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de un compuesto antibiótico o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. *Trichoderma* es uno de los microorganismos que poseen esta característica., varias cepas producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, que pueden llegar a inhibir el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico (Infante et al., 2009).

Entre los metabolitos no volátiles se encuentran: gliotoxina, viridina, trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina. Por otra parte, los compuestos volátiles, presentan un fuerte olor a coco, posiblemente relacionado con la actividad antagonista. Los antibióticos volátiles tienen un efecto especialmente fungistático, lo cual ayuda a debilitar al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, a este complejo se lo denomina como un "hiperparasitismo" de origen enzimático físico (Infante et al., 2009).

Además, el género *Trichoderma* puede tener ciertas enzimas hidrolíticas las cuales en la mayoría de los hongos patógenos actúan en su pared celular que está hecha de quitina y β -1-3- glucanos y la disolución o daño de esos polímeros estructurales desencadena un efecto adverso sobre el desarrollo y diferenciación de tales hongos (Harman & Kubieck, 1998).

En cuanto a la producción de metabolitos secundarios, *Trichoderma* libera estos compuestos con actividad antibiótica que, de igual manera, pueden ser volátiles y no volátiles. Estos metabolitos se clasifican en distintos grupos según su origen biosintético y su estructura química. (Ponmurgan & Ganesh, 2012). Los metabolitos que exhiben actividad antibiótica pueden ser metabolitos volátiles de bajo peso molecular (<3000 DA) y de naturaleza polar. Entre los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana más representativos del género *Trichoderma* están los peptaiboles, los poliquétidos y los terpenos (Cardoza et al., 2005; Reino et al., 2008).

Este mecanismo de control biológico permite que las especies de *Trichoderma* inhiban el desarrollo del patógeno a través de la liberación de sus metabolitos secundarios sin necesidad de contacto físico (Harman, 1998).

C. Competencia

La competencia es un mecanismo de antagonismo muy importante y se define como “el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás” (Infantes et al., 2009). Este tipo de antagonismo es ideal para aplicarlo como control biológico ya que, *Trichoderma* posee una gran velocidad de crecimiento, abundante esporulación y desarrollo, su presencia de forma natural diferentes sustratos donde logra crecer, hacen de este hongo muy eficiente como agente de control biológico (Infantes et al., 2009).

D. Inducción de resistencia sistémica en plantas

Existen dos mecanismos de defensa que les permite a las plantas resistir los ataques de patógenos: la resistencia sistémica adquirida (RSA) y la resistencia sistémica inducida (RSI). Estas se diferencian por la naturaleza del elicitador y las rutas metabólicas involucradas (Bermúdez, 2013). Los microorganismos benéficos en general funcionan como unas vacunas, es decir, los componentes de los hongos pueden activar la respuesta de la defensa cuando las plantas reconocen los MAMPs (microbe-associated molecular patterns) que son patrones moleculares que conservan un rasgo estructural parecido a microorganismos que no están presentes en la planta (Cardoza et al., 2005).

La capacidad de distintas cepas de *Trichoderma* para proteger a la planta frente a patógenos es posible ya que existe una asociación directa entre *Trichoderma* con las raíces de la planta lo cual estimula los mecanismos de defensa de la misma (Bermúdez, 2013). Las cepas de *Trichoderma* colonizan primero las raíces de las plantas, estimulan el crecimiento y confieren protección contra infecciones (Benito et al., 2000). La colonización implica la habilidad por parte del endófito de adherirse, reconocer la raíz, penetrar y resistir metabolitos tóxicos producidos por la planta en respuesta a la invasión de un organismo extraño (Bermúdez, 2013).

1.7 Objetivo general

Caracterización molecular y de patogenicidad de *Colletotrichum* spp, en bananas var Cavendish y pruebas de antagonismo con cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de fincas bananeras de la región costa del Ecuador.

1.8 Objetivos específicos

- Aislar *Trichoderma* a partir de muestras de suelos colectados en diferentes bananeras de la región costa del Ecuador
- Identificar el patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola* mediante técnicas microscópicas y a base de ADN.
- Aplicar soluciones de esporas de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola* en frutos de bananas en diferentes grados de maduración.
- Evaluar el grado de infección generado por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola* en frutos de bananas en diferentes grados de maduración.
- Evaluar *in vitro* el efecto de antagónico en competencia de *Trichoderma* spp., en el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola*.
- Determinar *in vitro* el efecto antifúngico de los metabolitos producidos por *Trichoderma* spp., en el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola*.
- Seleccionar las mejores cepas de *Trichoderma* spp., que muestren antagonismo en el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola*.

1.9 Sistema de Hipótesis

H₀: Existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola* sometidos a pruebas antagónicas con diferentes cepas de *Trichoderma* spp., aisladas.

H_A: No existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum frutícola* sometidos a pruebas antagonicas con diferentes cepas de *Trichoderma* spp., aisladas.

1.10 Justificación del Problema:

En el mundo, desde su inicio, han existido plagas y enfermedades que atacan a una gran variedad de plantas, de igual manera ha sido la naturaleza quien se encarga de mantener un equilibrio, controlando las poblaciones de organismos mediante depredadores, parásitos y otros medios naturales. En la actualidad, el manejo de plagas y enfermedades es un aspecto fundamental en la producción agrícola de alimentos para el consumo humano, en varios casos, implica la aplicación indiscriminada de pesticidas químicos para su control.

Por este motivo, en el Ecuador y otros países se abre una brecha a la investigación que sugiere otros métodos menos invasivos y más naturales que generen mayor alternativas para el manejo de plagas y enfermedades que azotan a los diferentes cultivos. Por ejemplo, el Ecuador es un país bananero, posee una superficie sembrada de banano de 317,798.72 hectáreas (FAOSTAT, 2013), aportando con ingresos que representan el 3,84% del PIB total, el 50% del PIB agrícola y el 20% de las exportaciones privadas del país (Sotomayor, 2010), pero su producción se ve dificultada por enfermedades que inhiben el adecuado desarrollo de la planta y deterioran la calidad de la fruta. Entre los patógenos causantes de daños en el banano se menciona los hongo *C. gloeosporioides* y *C. frutícola* los cuales representa un problema grave en poscosecha e influye significativamente en la calidad de la fruta mercadeable de los productores de banano del país y del mundo (Salazar et al., 2012).

La sintomatología de *Colletotrichum* spp, se presenta como lesiones hundidas ovaladas, oscuras y con una prominencia de masas de esporas (acérvulos). La infección en el fruto ocurre normalmente en campo durante su desarrollo, pero esta permanece latente hasta la maduración del fruto, de esta forma, la gravedad de la enfermedad se

manifiesta mayormente durante el almacenamiento y ciertos casos en los supermercados generando pérdidas importantes (Salazar et al., 2012).

Generalmente, para el control de la antracnosis se utilizan elevadas dosis de agroquímicos los cuales, en varios casos, poseen una alta toxicidad lo cual se traduce en un elevado riesgo para la salud del trabajador y consumidor. El banano es una de las frutas que dependen de altas cantidades de agroquímicos para el manejo de enfermedades tanto en campo como en poscosecha, (Coto, 2007). Actualmente, el manejo de la antracnosis en el banano se basa en la aplicación de fungicidas poscosecha como son: tiabendazol, imazalil, miclobutanil y azoxistrobina (Salazar et al., 2012). Estos fungicidas son de carácter sistémico lo cual puede tener cierta probabilidad de dejar residuos químicos en el fruto (Edifarm, 2014).

Con el objetivo de buscar nuevas alternativas para mejorar la productividad y calidad de la fruta, preservando el medio ambiente, es necesario centrarse en la investigación de controladores biológicos que ayuden a manejar la insensibilidad de la antracnosis a los fungicidas comerciales utilizados.

El uso de hongos antagonistas constituye una de las opciones más promisorias, entre estos resalta los buenos resultados que las especies de *Trichoderma* spp., han demostrado previamente para el control de hongos. Su habilidad para competir con otros agentes es muy reconocida, sin causar impacto ambiental, por tal motivo es necesario comprender los mecanismos que el género *Trichoderma* utiliza para contrarrestar la infección y minimizar los daños en los cultivos. Es necesario también ampliar el campo de organismos que pueden ser empleados en el biocontrol de patógenos en los cultivos ecuatorianos y reducir el uso de agroquímicos (Guigón et al., 2010).

La presente investigación tiene como objetivo la identificación funcional de cepas de *Trichoderma*, aisladas a partir de los propios suelos de las bananeras donde la Antracnosis representa un gran problema y someterla a ensayos duales, donde se desea probar el efecto antagónico que posee *Trichoderma* spp., realizando una aplicación directa de este biocontrolador ante los patógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola* bajo condiciones controladas sin generar ningún daño a la salud humana y al ambiente.

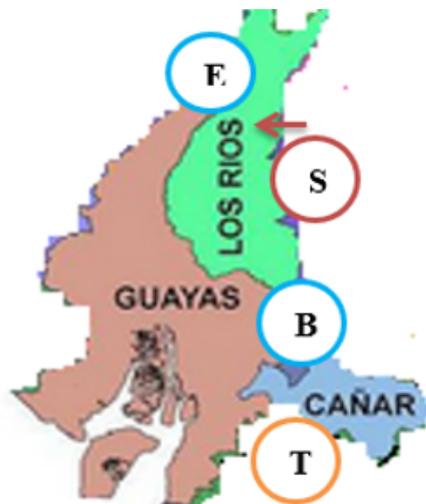
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Zona de Estudio

Las muestras de hojas de banana fueron colectadas en bananeras de la región costa del Ecuador provenientes de la provincia de Los Ríos. Por otra parte, las muestras de suelo fueron colectadas desde bananeras de la región costa del Ecuador, localizadas en la Provincia de Guayas: El Empalme y Bucay; Provincia de Cañar: La Troncal y finalmente,

Provincia de Los Ríos: San Juan como se indica en la tabla 5.

Tabla 5: Sitios de donde se enviaron las muestras de suelo y hojas



Provincia	Localización	Coordenadas geográficas	Código
Guayas	El Empalme	1° 02' 46" Sur 79° 38' 01" Oeste	E
Guayas	Bucay	2° 12' 17" Sur 79° 10' 40" Oeste	B
Cañar	La Troncal	2° 24' Sur 79° 20' Oeste	T
Los Ríos	San Juan	1° 33' 13" Sur 79° 32' 9" Oeste	S

2.2 Aislamiento de *C. gloeosporioides* y *C. frutícola*

A partir de hojas de banano que presenten síntomas de antracnosis, se aislaron las cepas del patógeno. Primero, se desinfectó el material vegetal mediante el protocolo de desinfección con cloro y detergente (Salazar & Surga, 1988). Luego se sembró las hojas en medio de Potatoe Dextrose Agar (PDA). Se lo dejó incubar durante 7 días a

28°C para luego observar su estructura microscópicamente y posteriormente se evaluó molecularmente (fig 3 y 4).

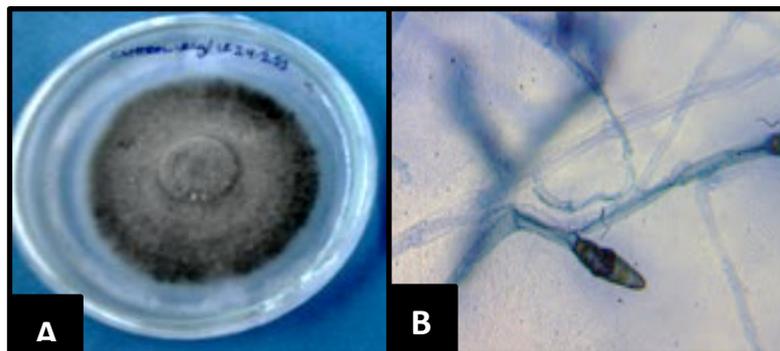


Figura 3: Fotografía macroscópica (A) y microscópica 100X (B) de la cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* aislada de hojas recolectadas en una bananera en la provincia de Los Ríos (Riera, 2015).

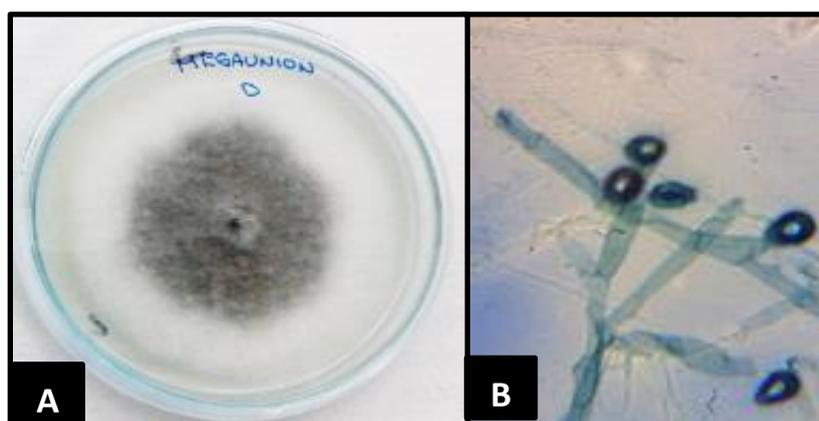


Figura 4: Fotografía macroscópica (A) y microscópica 100X (B) de la cepa de *Colletotrichum fruticola* aislada de hojas recolectadas en una finca bananera Megaunión en la provincia de Los Ríos (Riera, 2015).

2.3 Identificación molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum frutícola*

Para la identificación molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola*, los hongos se inocularon en 50 ml de caldo PDB (Potato dextrosa broth) a una temperatura de 27°C sin agitación durante un periodo de 7 días.

Luego de este periodo de incubación se procedió a separar el micelio sólido del cultivo líquido empleando un papel filtro previamente esterilizado.

Para la extracción de ADN, se utilizó el método descrito por Colombo y colaboradores (1998), modificado por la Facultad de Química de la Universidad de Uruguay (2011). Brevemente, se obtienen el material biológico pulverizando, el micelio, en un mortero. Para facilitar este proceso se añade nitrógeno líquido a la preparación. La muestra resultante se recolectó en un tubo de polipropileno de 1,5ml de capacidad nominal con tapa clip. Se agregó 500µl de CTAB y se incubó en un baño maría a 65°C durante 1 hora. Luego, se añadió un volumen de 500µl de la solución fenol: cloroformo: isoamílico en una proporción 25:24:1 respectivamente, y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo. Se añadió 500µl de etanol frío al 98%. La muestra fue almacenada por 2 horas a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 100µl de etanol al 70%. Este proceso de lavado se repite una vez más. Se procedió a secar el Pellet durante 2 horas o hasta que desaparezca el olor a etanol, dejando los microtubos boca abajo sobre un papel. El pellet fue resuspendido con un volumen de 50µl de agua grado molecular. Se agregó 5µl de la enzima RNAsa, y se incubó a 37°C por 1 hora. La muestra de ADN genómico se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Para corroborar la eficiencia de la extracción, se corrió un gel de agarosa al 2 %, adicionando 2 µl de 5X Green Go Taq Flexi Buffer. Se depositó 6µl de cada muestra en los pocillos del gel y se corrió en una cámara de electroforesis horizontal gel xL ENDURO Labnet a 80 voltios durante 40 minutos. Las muestras en el gel fueron visualizadas en el Fotodocumentador Enduro GDS de luz ultravioleta.

2.3.1. Amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s por la técnica PCR.

La amplificación mediante PCR convencional de las regiones ITS1, ITS4 y 5.8 ARN ribosomal, se realizó utilizando los primers universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC -3') (Hermosa, y otros, 2000). La técnica utilizada de amplificación fue estandarizada en el laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito según las condiciones que se detallan en las tablas 6 y tabla 7.

Tabla 6: Programa de PCR para la amplificación de las regiones ITS de hongos (Muñoz, 2012).

Desnaturalización previa	95 °C	5:00 minutos	35 CICLOS
Desnaturalización	94 °C	1:00 minutos	
Hibridación	58.6 °C	2:00 minutos	
Polimerización	72 °C	2:00 minutos	
Extensión Final	72 °C	10:00 minutos	
Reposo	4 °C	10:00 minutos	

Tabla 7: Protocolo empleado para la PCR de las regiones ITS del ARN ribosomal 5.8s de hongos (Muñoz, 2012)

Reactivos	Volumen para 1x
Buffer 10 X	5µl
MgCl ₂	4µl
dNTPs(10mM)	2µl
Primer ITS1(10pmol)	2µl
Primer ITS4(10pmol)	2µl
Taq polimerasa	1µl
ADN	2µl
H ₂ O	32µl
Volumen total	50µl

La técnica de PCR se llevó a cabo en el termociclador Labnet M Multigene Gradient 1011020. El producto amplificado fue observado en una cámara de electroforesis horizontal gel xL ENDURO Labnet a 80 voltios durante 40 minutos; en un gel de agarosa al 2% con 2µl de Dyamond Nucleic Acid Dye. El marcador molecular empleado fue de 100pb de Promega. Las muestras en el gel se visualizaron en el Fotodocumentador Enduro GDS de luz ultravioleta.

2.3.2. Purificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S amplificadas.

Los productos amplificados obtenidos fueron purificados empleando el Kit de Purificación de Invitrogen. Este paso es muy importante para eliminar cualquier tipo de impureza que no forme parte de la región amplificada y que puede estar presente en la muestra (Anexo C).

2.3.3. Secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S amplificadas.

El producto amplificado fue concentrado a 50ng/µl y el volumen obtenido fue de 20µl. La concentración de ADN de las muestras, se obtuvo a través del Kit de Invitrogen. Las muestras fueron enviadas a la compañía Macrogen de Seoul Corea, para su secuenciación. La información de las secuencias remitidas por Macrogen, fueron editadas y analizadas para poder compararlas con los bancos de datos Gen Bank de la NCBI y determinar la especie del hongo en estudio.

2.4 Prueba de patogenicidad de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum frutícola* en bananas var. Cavendish en diferentes grados de maduración.

Para la infección con los fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum frutícola* se realizó un concentrado de esporas el cual consiste en preparar una solución estéril de PDB (Potatoe Dextrose Broth). Luego, se añaden 20ml de PDB sobre el hongo y con ayuda de un ansa realizar un frotis de toda la superficie de

los hongos. Posteriormente, se filtró través de una lámina de algodón y sobre un embudo las esporas mezcladas con la solución PDB. Esto se requiere para impedir el paso de micelio y otras estructuras diferentes de esporas. Se colocó el restante de la suspensión de esporas en tubos eppendorf de 2ml que fueron centrifugados durante 5 min a 600rph. Se descartó el 70% del sobrenadante y se mezcló cuidadosamente el restante (Cañedo y Ames, 2004). Se realizó el conteo de esporas con 10ul de la solución final en la Cámara de Neubauer, contando la cantidad de esporas presentes en cinco cuadrantes diferentes. Para conocer la cantidad de esporas obtenidas se utilizó la siguiente fórmula.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10\,000}{\text{número de cuadrantes}}$$

(Bastidas, 2015)

Finalmente, para el ensayo de patogenicidad a las bananas se les realizó una herida circular de 1mm de diámetro en donde se inoculo con una micropipeta 5ul del concentrado de esporas perteneciente a *C. gloeosporioides* y *C. frutícola*. La evaluación se realizó durante diecisiete días, las mediciones fueron tomadas cada dos días, debido al crecimiento lento del patógeno, en donde se midió el diámetro de infección generada por los fitopatógenos.

Utilizando la Escala de Von Loesecke (fig 5) para medir el grado de la maduración en bananas se eligieron la fruta a infectar (Ramírez et al., 2011).

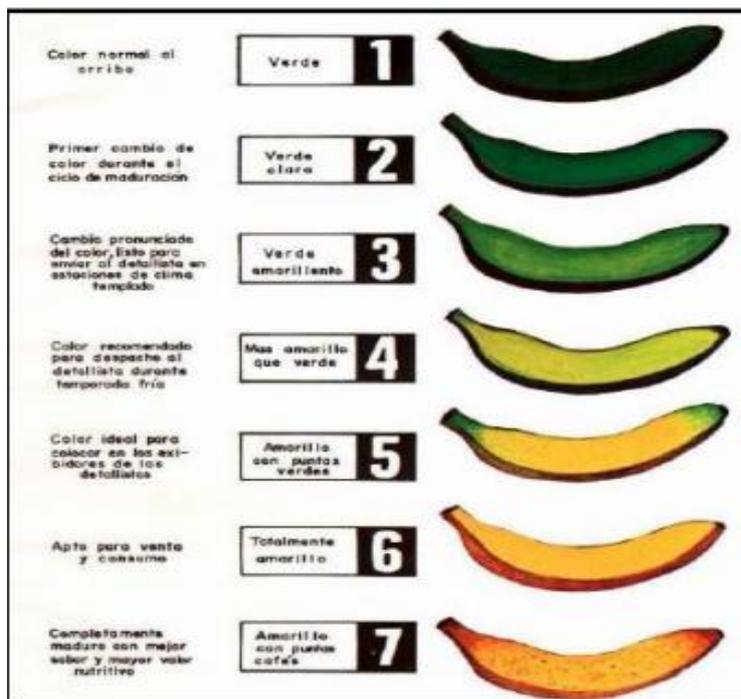


Figura 5: Escala de Von Loesecke para medir la maduración de banano (Ramírez et al., 2011)

2.5 Aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp

Las muestras de suelos recibidas, fueron sometidas a la técnica de concentración de conidios de Gerdermann y Nicholson (1963), modificado en el Laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad San Francisco de Quito (Anexo A). El método de concentración de conidios consiste en homogenizar las muestras de suelo, luego pesar 60 gr de la muestra y mezclar con agua destilada estéril. Luego se filtró a través de un tejido nylon y los filtrados obtenidos se concentran sucesivamente en tubos de 50 ml empleando el vortex, de tal manera que se consiga una muestra final con un concentrado de conidios. A continuación, se realizó alícuotas extrayendo 1000 ul del concentrado de conidios y mezclándolos con 9ml de agua destilada estéril. Después, se tomó una alícuota de 100 ul de los tubos diluidos y se inocula en toda la superficie de la caja petri con el medio de cultivo selectivo para *Trichoderma* spp. (Anexo B) (Harman & Kubicek, 1998). Las cajas petri inoculadas con el concentrado de conidios en el medio selectivo para *Trichoderma* spp., fueron incubadas durante 14 días a 28 °C (Cobos, 2010). El material fúngico que se obtuvo en las cajas petri después de su período de

incubación, fue repicado en medio Potato Dextrosa Agar e incubado durante 7 días a 28°C.

2.6 Purificación de cepas de *Trichoderma* spp

Para la purificación de las cepas de *Trichoderma*, se aplicó el procedimiento de cultivos monospóricos con la finalidad de conseguir colonias aisladas en cajas petri. Esto se consiguió realizando diluciones decimales seriadas de la muestra, empezando con una dilución 10^{-1} mezclando 1 ml de la muestra con 9 ml de diluyente hasta conseguir la dilución 10^{-4} . Finalmente, para sembrar estas diluciones se aplicó el método por estría (Universidad de Granada, 2013).

2.7 Crio conservación de cepas de *Trichoderma* spp., *C. gloeosporioides* y *C. frutícola*

La crio conservación es una técnica que se utiliza para mantener el material fúngico durante largos periodos de tiempo a bajas temperaturas. A través de esta técnica, se conservaron a las cepas aisladas de *Trichoderma*, *C. gloeosporioides* y *C. frutícola*. Esta técnica consiste en introducir una porción del hongo en tubos eppendorf que contengan una solución crio protectora de glicerol al 10% y de "skim milk" auto clavadas, e inmediatamente se debe almacenar en el congelador a -80°C (Dahmen et al., 1982).

2.8 Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola*

El efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola* se estudió utilizando cultivos duales. Este método consistió en sembrar en los extremos de una caja petri con medio de cultivo de Potatoe Dextrosa Agar, un disco de ocho milímetros de diámetro del hongo patógeno e incubarlo por cinco días y luego sembrar al otro extremo al hongo antagonista. Las cajas petri fueron incubadas a 28°C durante siete días. Los valores de crecimiento fueron registrados cada 24 horas. Para el control se sembraron en cajas petri discos de ocho milímetros del patógeno y de las cepas de *Trichoderma* spp., luego se incubaron a 28°C durante siete días (Magdama, 2010). La finalidad de este ensayo es evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición radial} = \frac{R1-R2}{R1} * 100$$

Dónde R1 es igual al radio promedio del patógeno testigo (cm) y R2 es el radio promedio del patógeno (cm) en el tratamiento con cepas de *Trichoderma* (fig 6, 7).

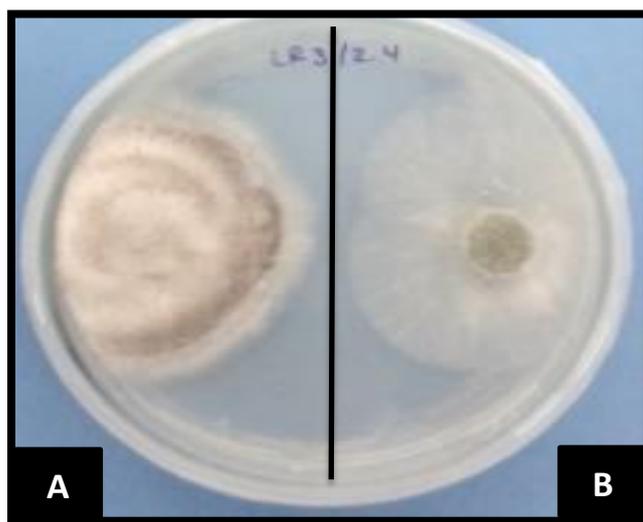


Figura 6: Fotografía de cultivos duales. (A) *C. gloeosporioides* y (B) *Trichoderma* spp., L2.4SJ (Riera, 2015).

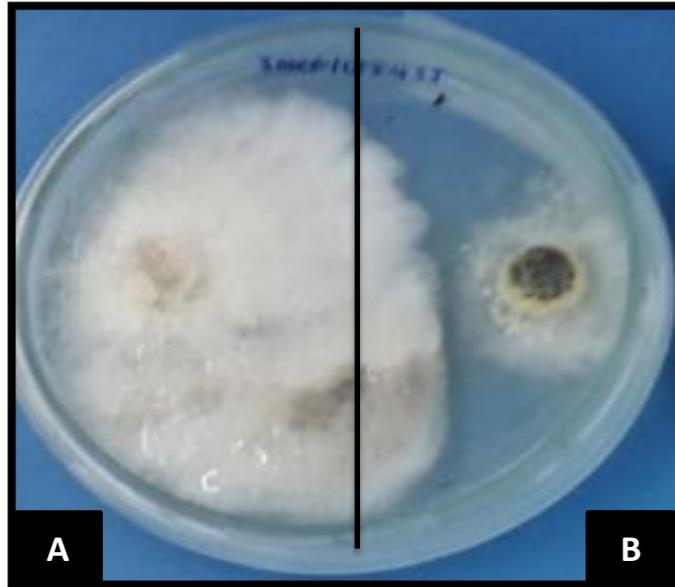


Figura 7: Fotografía de cultivos duales. (A) *C. fruticola* y (B) *Trichoderma* spp., LR 2.4 SJ (Riera, 2015)

2.9 Valoración de filtrados fúngicos de cepas de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola*

Las especies de *Trichoderma* se caracterizan por presentar como mecanismo antagonista frente a los fitopatógenos la producción de toxinas, moléculas con actividad antibiótica y enzimas hidrolíticas. Por lo tanto, se experimentó si las cepas de *Trichoderma* aisladas de fincas bananeras de la región costa del Ecuador producen este tipo de sustancias. Luego se probó el efecto fungistático de los filtrados de las diferentes cepas a una concentración del 40% de metabolitos sobre el patógeno (Magdama, 2010).

Para la obtención de los filtrados, se tiene que sembrar discos de ocho milímetros de diámetro de *Trichoderma* en matraces erlenmeyers con 50 ml de medio PDB (potato dextrose broth). Estos medios de cultivo fueron introducidos en una incubadora con agitación a 27 °C a 150 rpm, durante siete días, con el fin de que crezca el micelio del hongo. Después, se procedió a filtrar el extracto líquido obtenido del micelio empleando papel filtro estéril y también a través de filtros millipore de 0.22 μ m.

Luego de la obtención de los filtrados, se evaluó cómo éstos controlaron al patógeno y para ello se debe inocular en el centro de una caja petri con medio PDA, un disco miceliar de *C. gloeosporioides* y de *C. fruticola* (fig8, 9), luego se incubó por siete días. Fueron registrados los valores de crecimiento cada 24 horas durante los siete días de incubación, finalmente, se evaluó el porcentaje del crecimiento radial (Ruano et al., 2003).

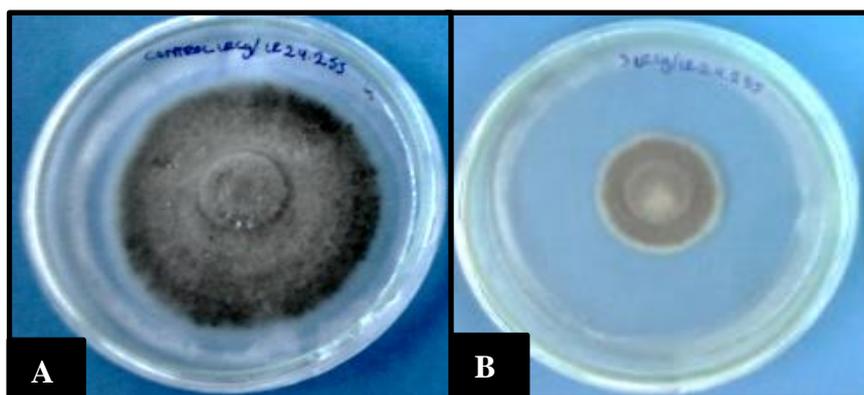


Figura 8: Evaluación de filtrados de cepas. A) Control *Colletotrichum gloeosporioides* + PDA, B) *Colletotrichum gloeosporioides* + 40% antibiótico de *Trichoderma* spp., LR 2.4.2 SJ (Riera, 2015).

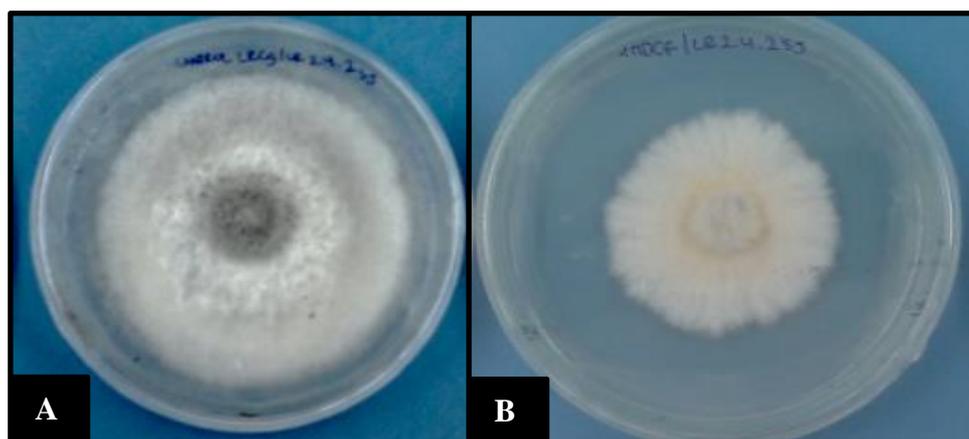


Figura 9: Evaluación de filtrados de cepas. A) Control *Colletotrichum fruticola* + PDA, B) *Colletotrichum gloeosporioides* + 40% antibiótico de *Trichoderma* spp., LR2.4.2SJ (Riera, 2015).

RESULTADOS

3.1 Aislamiento e identificación funcional de cepas de *Trichoderma* a partir de muestras de suelos recolectadas en diferentes bananeras de la costa del Ecuador

En tres provincias localizadas en la costa del Ecuador, se recolectaron 30 muestras de suelo de la rizósfera de cultivos de banano. A partir de estas muestras se logró aislar 11 cepas de *Trichoderma*, aplicando la metodología para el aislamiento de *Trichoderma* spp. (Medio selectivo TSM y cultivos monospóricos). Los datos de las localidades y códigos de las muestras se presentan en la tabla 8.

Tabla 8: Cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de diferentes fincas bananeras del Ecuador.

Muestra	Provincia	Localidad	Código
A	Guayas	Bucay	Tricho GAB
B	Guayas	Bucay	Tricho G2AB
C	Guayas	Bucay	Tricho GSNB
D	Guayas	El Empalme	Tricho GAEE
E	Guayas	El Empalme	Tricho GBEE
F	Cañar	La Troncal	Tricho C3.2LT
G	Cañar	La Troncal	Tricho C3.3LT
H	Cañar	La Troncal	Tricho C3.4LT
I	Cañar	La Troncal	Tricho C3.5LT
J	Los Ríos	San Juan	Tricho LR2.4.2SJ
K	Los Ríos	San Juan	Tricho LR2.4SJ

Las cepas de *Trichoderma* spp, fueron incubadas en medio PDA (Potato Dextrosa Agar) para su visualización (fig. 10A). Macroscópicamente se observó la rápida formación de colonias a partir de las 24 horas de incubación. Adicionalmente, se pudo ver como este hongo cambio su coloración del micelio compacto de blanquecino amarillo a verde claro u oscuro, este fenómeno se dio debido a la esporulación de *Trichoderma* (fig. 10B).

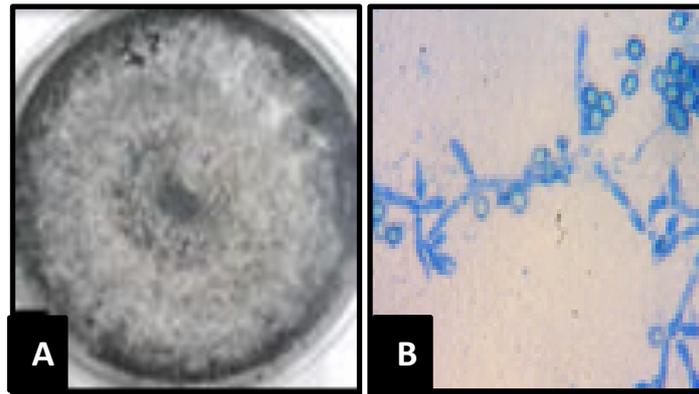


Figura 10: Fotografía de la cepa de *Trichoderma* C3.2LT aislada de La troncal, Cañar. A) Macroscópica, césped miceliar aplanado en forma de anillos B) Microscópica 100X conidióforos en forma piramidal y ramificados.

Microscópicamente se observó que el patrón de distribución de los conidióforos es en forma piramidal o cónica, son erectos, altamente ramificados, no verticilados y tabicados (Guigón et al., 2010). Los conidios que se forman a partir de células conidiógenas, enteroblásticas, fialídicas se agruparon al final del conidióforo y presentaron formas ovoides, elipsoidales y redondas, con pared lisa, de color verde brillante (Harman et al., 1998). En la figura 11 se muestran las 11 cepas aisladas con las características morfológicas descritas anteriormente.

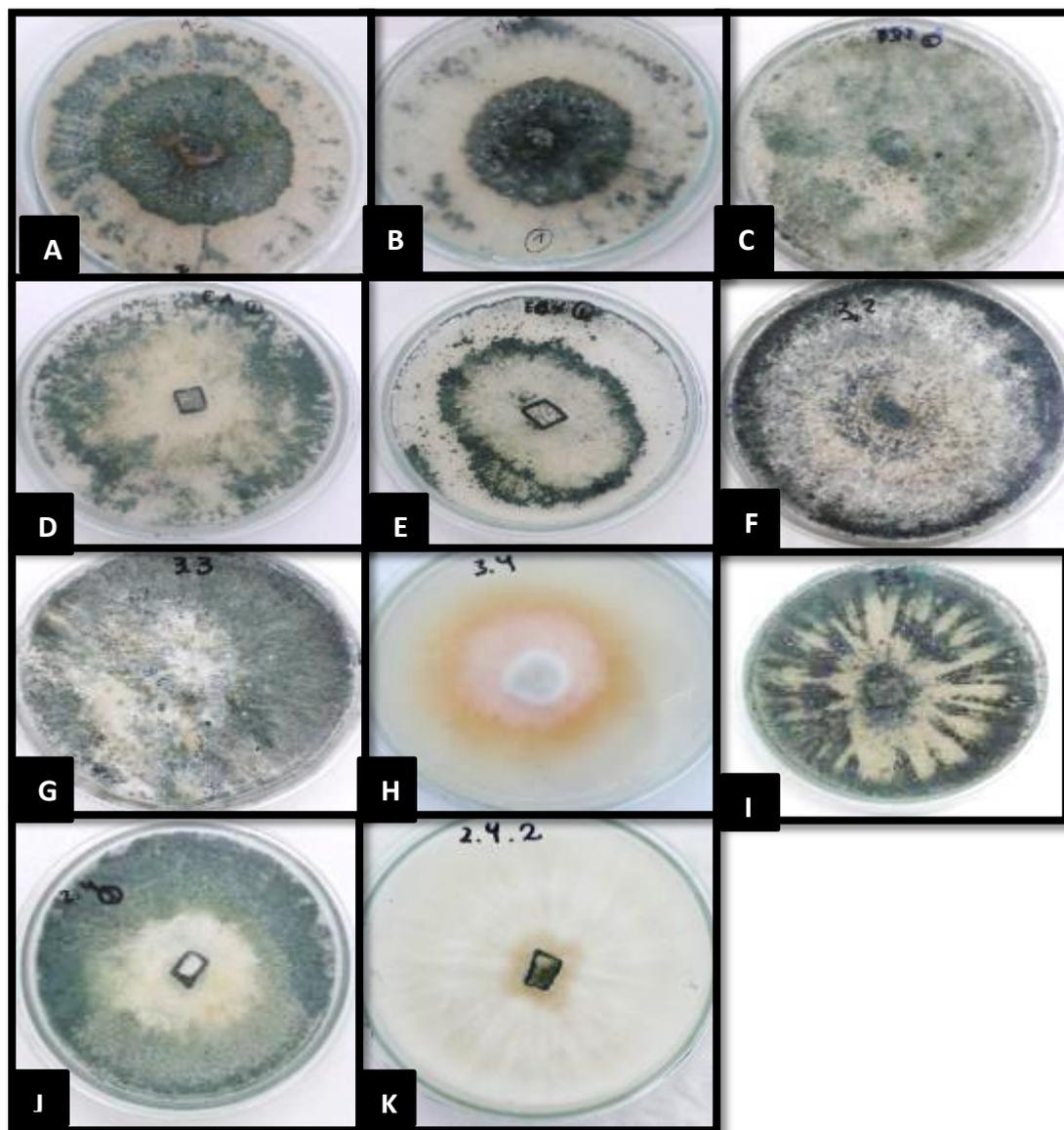


Figura 11: Fotografías macroscópicas de las cepas de *Trichoderma*: A) GAB Bucay; B) G2AB Bucay; C) GSNB Bucay; D) GAEE El Empalme; E) GBEE El Empalme; F) C3.2LT La Troncal; G) C3.3LT La Troncal; H) C3.4LT La Troncal; I) C3.5LT La Troncal; J) LR2.4 San Juan; K) LR2.4.2 San Juan (Riera, 2015)

3.2 Aislamiento e identificación morfológica de fitopatógeno

Colletotrichum gloeosporioides y *Colletotrichum fruticola*

Luego de aislar los fitopatógenos a partir de hojas infectadas, se procedió a identificarlos. *C. gloeosporioides* y *C. fruticola* en medio PDA (Potato dextrose agar) a los 7 días de incubación a 27°C, presentaron unas colonias compactas afelpadas, filamentosas de borde regular que se puede observar en cara frontal de la caja Petri, de igual manera, en esta cara se observó una coloración que varió desde un color blanco en los extremos más jóvenes del micelio hasta un fuerte color gris para *C. gloeosporioides* y para *C. frutícola*, la coloración fue de anillos blancos y grises. Por otra parte, al revés de la caja Petri se observó un color blanco en los extremos más jóvenes, seguido por un halo anaranjado, posteriormente se presenta una sección de color gris oscuro y finalmente un color anaranjado como muestra la figura 12.

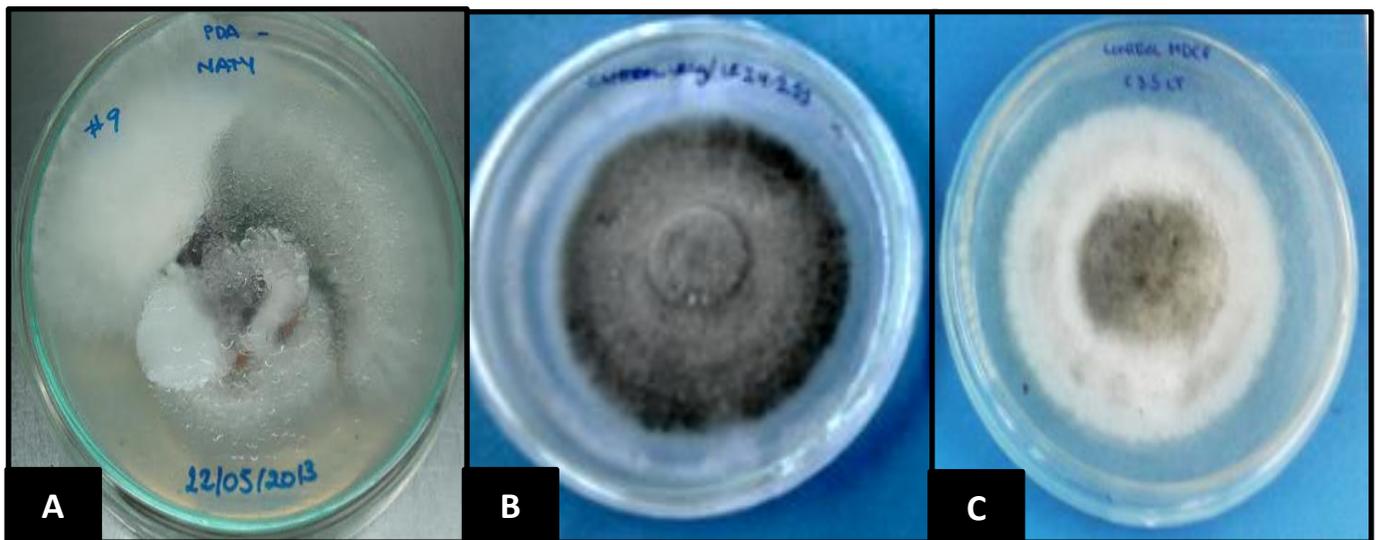


Figura 12: Aislados de *Colletotrichum* spp. A) Crecimiento de patógeno directamente de explante de hoja, B) Cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* purificada. C) Cepa de *Colletotrichum frutícola* purificada.

Microscópicamente se observaron hifas elongadas, distorsionadas y sus conidios rectos de forma elipsoide-fusiforme con una pigmentación gris claro (figura 13).

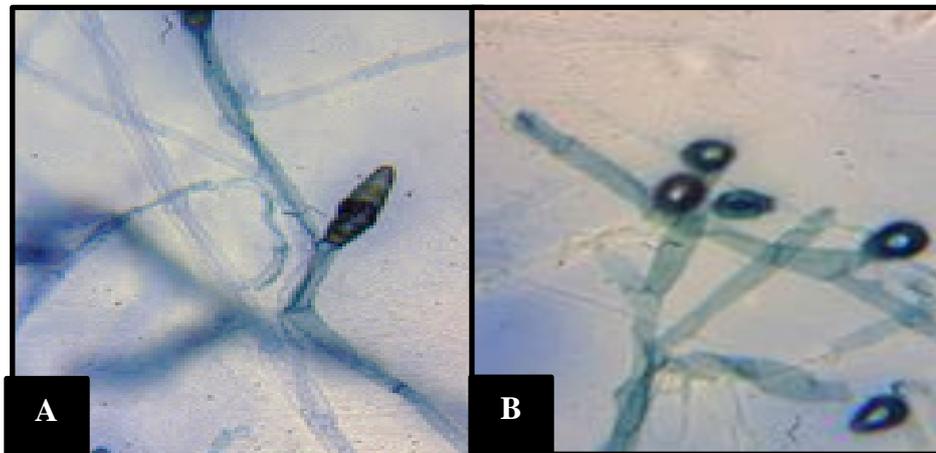


Figura 13: Identificación microscópica de A) *C. gloeosporioides* B) *C. fruticola* (Riera, 2015).

3.3 Caracterización molecular de *C. gloeosporioides* y *C. fruticola*

Las muestras de ADN de los fitopatógenos fueron visualizadas en un gel de agarosa al 2%, como se muestra en la fig 14. Con el fin de cuantificar la concentración de ADN obtenida se utilizó el nanodrop; a partir de las concentraciones medidas, se modificaron hasta alcanzar una concentración de 50ng/μl.

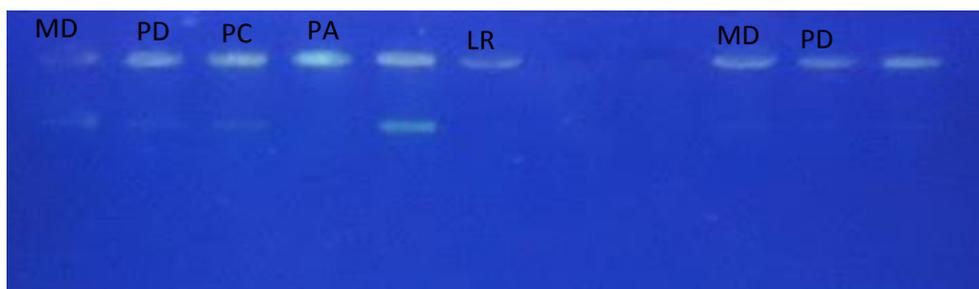


Figura 14: Gel de agarosa al 2%, visualización de presencia de ADN genómico obtenida del fitopatógeno aislado de fincas bananeras localizadas en la provincia de Los Ríos: Megaunión (MD), Producvista (PA, PC, PD), Los Ríos (LR) (Riera, 2015).

La concentración recomendada para la amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S es de aproximadamente entre 10 y 20 ng/ μ l (Salgado, 2011), lo que significa que la concentración y calidad de ADN es óptimo para continuar con la amplificación.

3.3.1. Amplificaciones de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S.

De acuerdo al protocolo estandarizado en el Laboratorio de Agrobiotecnología de la USFQ se obtuvieron bandas de 600pb. Todos los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 2 % (figura 15).

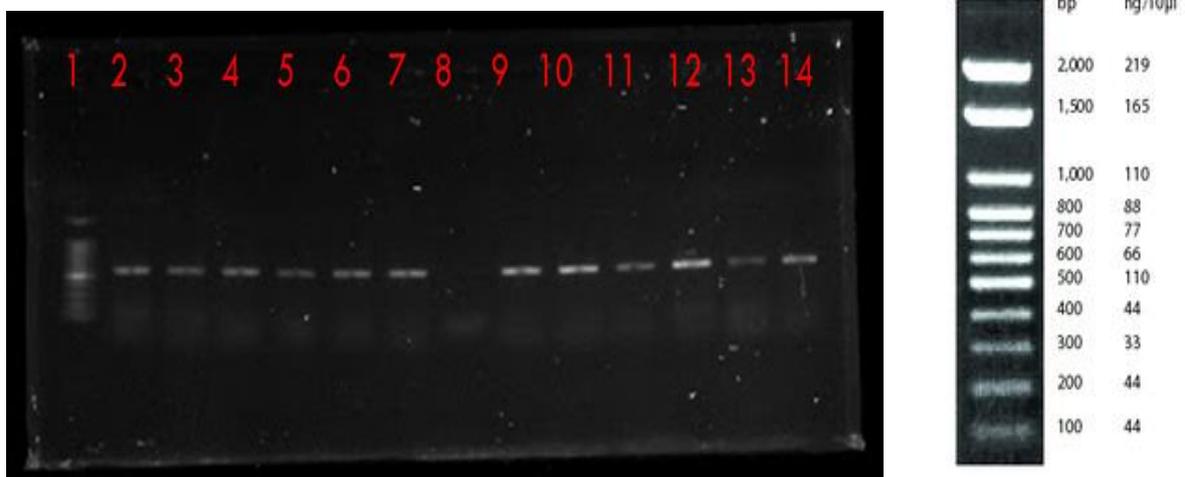


Figura 15: ADN amplificado, alrededor de 600 bp. 1) Marcador Molecular; posillos 2, 3, 4) Producvista A; posillos 5,6) Producvista C, posillos 7, 8) Producvista D, posillos 9, 10, 11, 12) Los Ríos, posillos 13, 14) Megaunión D. (Riera, 2015)

3.3.2. Secuenciación y análisis de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S.

Los productos amplificados de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S se enviaron a secuenciar al Laboratorio MacroGen Inc. en Seúl, Corea. Los resultados fueron recibidos vía electrónica (figura 16 y 17).

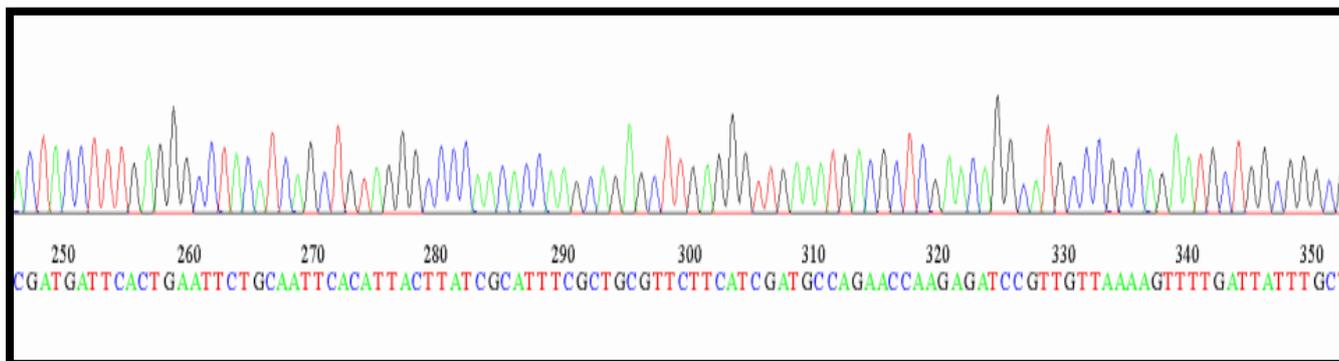


Figura 17: Fragmento de un electroferograma de la región ITS4 del ADN ribosomal 5.8S del fitopatógeno *C. gloeosporioides* desde 250pb hasta 350pb (Riera, 2015).

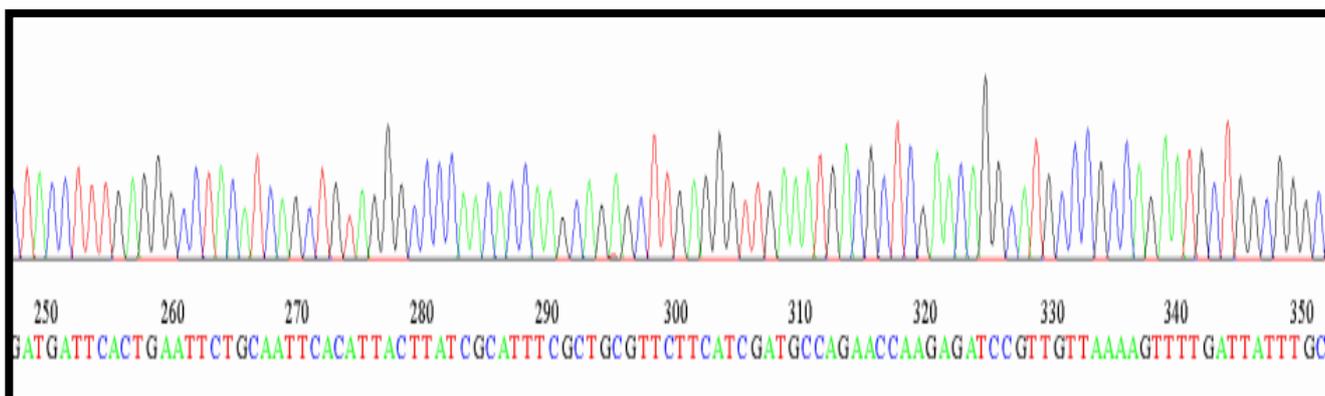


Figura 16: Fragmento de un electroferograma de la región ITS4 del ADN ribosomal 5.8S del fitopatógeno *C. fruticola* desde 250pb hasta 350pb (Riera, 2015).

Los datos recibidos de la secuenciación por parte del laboratorio Macrogen fueron editados, es decir, se eliminó el ruido generado durante la secuenciación, y posteriormente las secuencias resultantes fueron alineadas con la ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). La secuencia obtenida fue introducida en este programa con la finalidad de conseguir la identificación a nivel de especie, esto fue analizado en base al porcentaje de similitud con las secuencias de los organismos que forman parte de la base de datos del Gen Bank de la NCBI (figura 18).

A	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	Colletotrichum gloeosporioides isolate OORC25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	767	1023	100%	0.0	97%	JX902430.1
	Colletotrichum fragariae strain BF51 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	761	761	100%	0.0	97%	KC411911.1
	Colletotrichum gloeosporioides isolate OORC30 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	760	953	100%	0.0	98%	JX902434.1
	Colletotrichum gloeosporioides isolate OORC21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	730	923	100%	0.0	96%	JX902427.1
	Colletotrichum gloeosporioides strain FS1-PS4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	726	838	100%	0.0	100%	KP900226.1
	Fungal sp. SNB-GTC2401 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	723	835	100%	0.0	99%	KF164319.1
	Fungal endophyte strain I12F-01903 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	719	825	100%	0.0	99%	KR080840.1
	Colletotrichum gloeosporioides isolate ColoTIN04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	719	831	100%	0.0	99%	KF053200.1
	Colletotrichum gloeosporioides isolate A238 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	719	831	100%	0.0	99%	HM222963.1

B	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	Colletotrichum fruticola isolate R002b 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	647	647	100%	0.0	100%	KC860041.1
	Colletotrichum fruticola isolate CD009h 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	647	647	100%	0.0	100%	JN715843.1
	Colletotrichum fruticola strain C1316.20 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	647	647	100%	0.0	100%	JX010172.1
	Colletotrichum ignotum strain E183 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	647	647	100%	0.0	100%	GU994367.2
	Fungal sp. E13022C internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	640	640	100%	7e-180	99%	KF447477.1
	Fungal sp. E13018A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	640	640	100%	7e-180	99%	KF447464.1
	Fungal sp. E13014B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	640	640	100%	7e-180	99%	KF447455.1
	Fungal sp. E13013B internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	640	640	100%	7e-180	99%	KF447453.1
	Colletotrichum fruticola strain CCTU 1221 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	640	640	100%	7e-180	99%	KP716985.1
	Colletotrichum fruticola strain CCTU 1014 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene	640	640	100%	7e-180	99%	KP716983.1

Figura 18: Resultado de la identificación los fitopatógeno según la base bioinformática Gen Bank del NCBI, usando BLAST. A) *Colletotrichum gloeosporioides*. B) *Colletotrichum fruticola* (Blast, 2015).

A partir de los resultados adquiridos, se presenta a continuación en tabla 9 en la cual se resume los diferentes aislados de *Colletotrichum* spp, obtenidos a partir de hojas infectadas de banano.

Tabla 9: Aislados de *Colletotrichum* spp

Muestra	Provincia	Localidad	Resultado molecular	Código
A	Los Ríos	San Juan	<i>Colletotrichum frutícola</i> isolate R002b	Producvista A
B	Los Ríos	San Juan	<i>Colletotrichum frutícola</i> Isolate OCC97	Producvista C
C	Los Ríos	San Juan	<i>Colletotrichum frutícola</i> Isolate OCC97	Producvista D
D	Los Ríos	San Juan	<i>Colletotrichum frutícola</i> isolate R002b	Megaunón D
E	Los Ríos	San Juan	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i> strain JS12	Los Ríos

3.4 Infección de *C. gloeosporioides* en diferentes grados de maduración de banana var. Cavendish

Cuando se evaluó durante 17 días la infección ocasionada por este fitopatógeno, se observó que ésta se incrementó mientras la fruta maduraba, afectando la fruta en todos los grados de maduración sometidos a experimentación (fig 19 y 20).



Figura 19: Análisis de patogenicidad de *C. gloeosporioides*. A) Control día 3, B) Control día 9, C) Control día 17 (Riera, 2015).

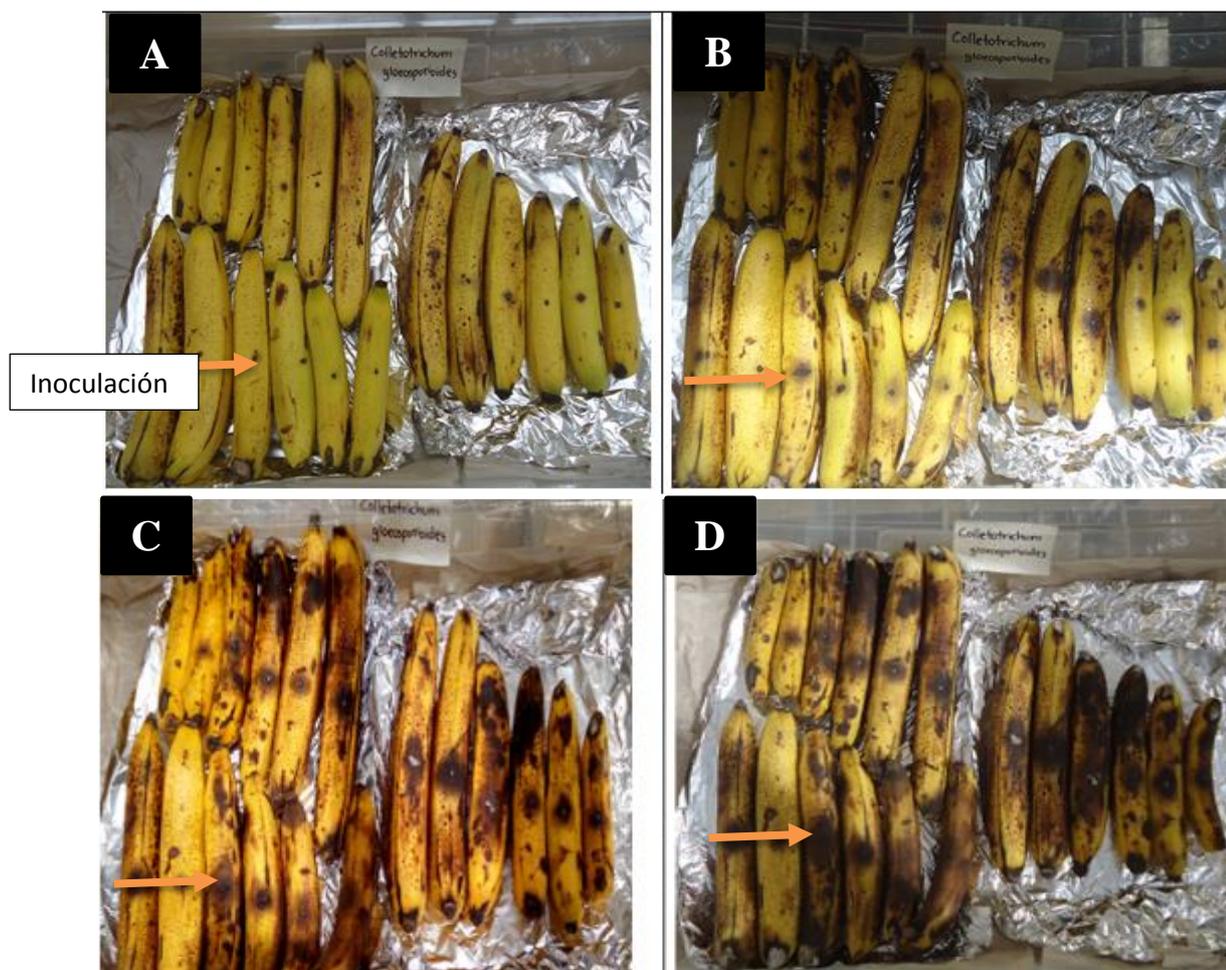


Figura 20: Análisis de patogenicidad de *C. gloeosporioides*. A) Daños día 3, B) Daños día 7, C) Daños día 14, D) Daños día 17 (Riera, 2015)

En cuanto al desarrollo de la enfermedad el crecimiento fue lento, la infección se encontraba en un rango de 2-27mm. No se observaron lesiones hasta el séptimo día entre los grados de maduración 3-6 (fig 21).

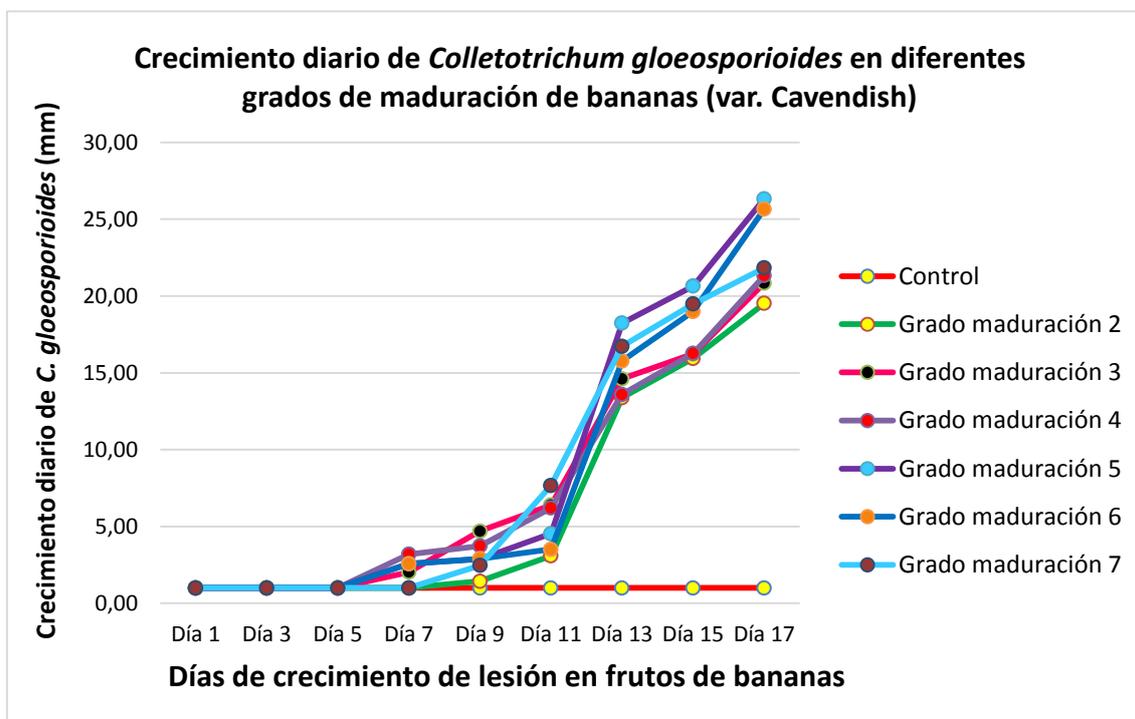


Figura 21: Análisis de patogenicidad de *C. gloeosporioides*. Crecimiento diario en mm del patógeno en cada grado de maduración de bananas durante diecisiete días

Las lesiones observadas en el fruto de la banana generadas por el ataque del patógeno *C. gloeosporioides* fue altamente significativa ($p=0,002$). Sin embargo, la prueba de separación de medias Tukey, indicó que solo el control fue diferente del resto de tratamientos (fig 22).

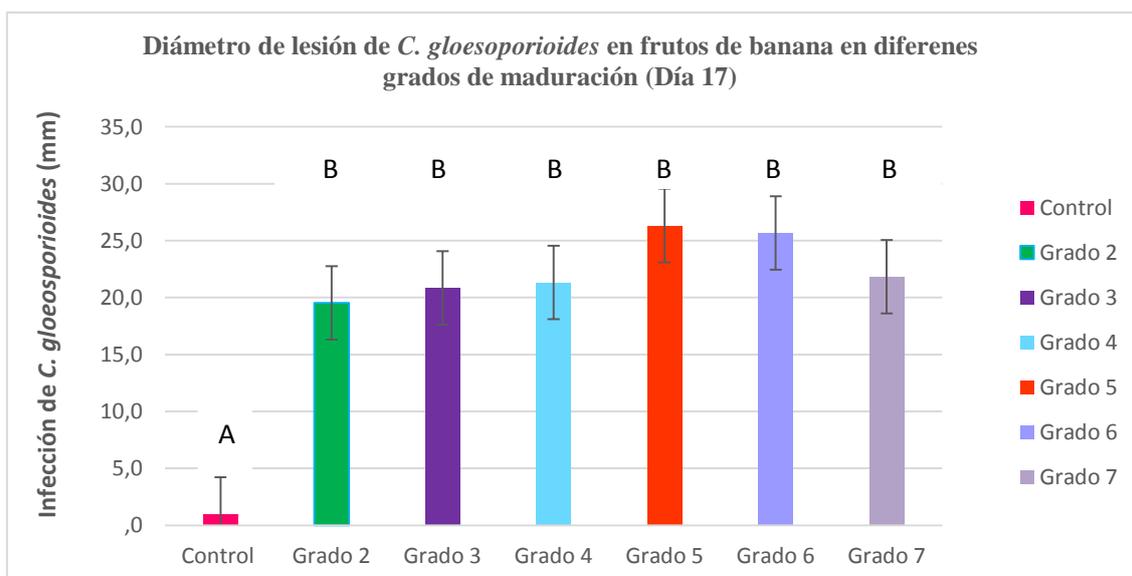


Figura 22: Diámetro de crecimiento de las lesiones (mm, día 17) en frutos de banana en diferentes grados de maduración.

Con el objetivo de observar la diferencia entre cada tratamiento se realizó una prueba de t-student (Anexo D). A continuación en la tabla 10 se muestran las comparaciones entre cada tratamiento.

Tabla 10: Valores p de significancia para cada comparación de tratamientos

Tratamiento	T-student p value
Grado 2 y grado 7	p= 0,745
Grado 2 y grado 6	p= 0,500
Grado 2 y grado 5	p= 0,383
Grado 2 y grado 4	p= 0,795
Grado 2 y grado 3	p= 0,699

No existió ninguna diferencia significativa entre los tratamientos ya que superan el valor $p=0,05$.

3.5 Infección de *C. fruticola* en diferentes grados de maduración de banana var. Cavendish

De igual manera, el control para el análisis de patogenicidad se realizó inyectando 5ul de PDB en bananas en diferentes grados de maduración. Esta prueba tuvo una duración de 17 días en los cuales se midió las lesiones causadas por *C.*

frutícola cada dos días la infección resultante por este fitopatógeno, se incrementó mientras la fruta maduraba más (fig 23 y 24).

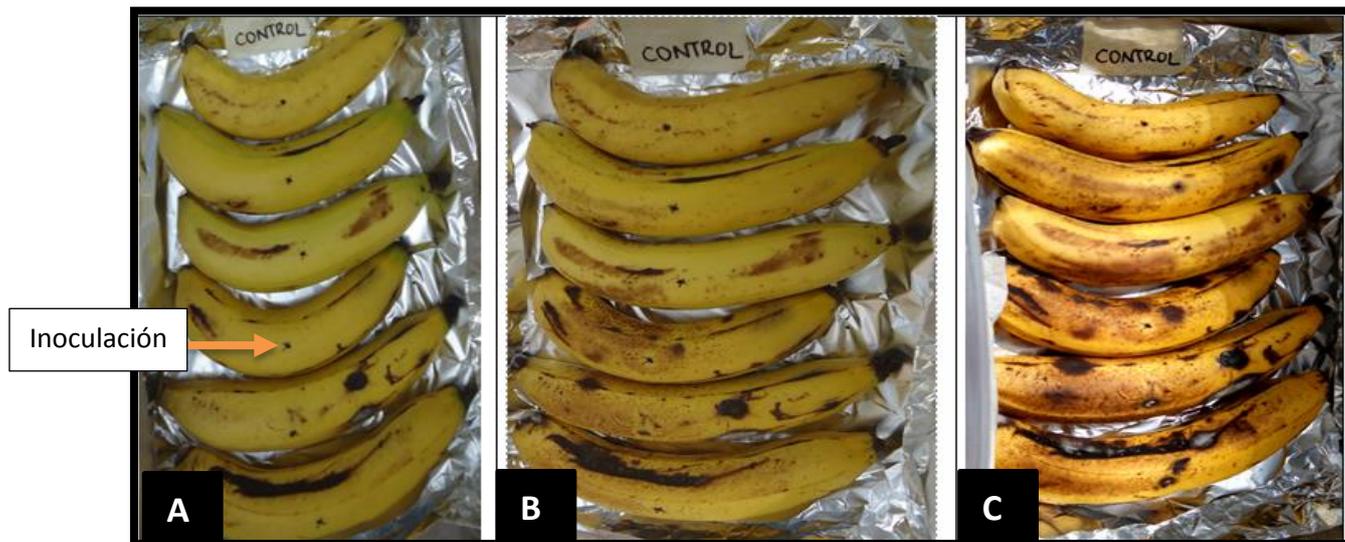


Figura 23: Análisis de patogenicidad de *C. fruticola*. A) Control día 3, B) Control día 9, C) Control día 17 (Riera, 2015)



Figura 24: Análisis de patogenicidad de *C. fruticola*. A) Daños día 2, B) Daños día 7, C) Daños día 13, D) Daños día 17

Por otra parte, *C. fruticola* demostró un crecimiento más lento en comparación a *C. gloeosporioides*, este patógeno mostró que necesitaba que la fruta madure para que se incremente la severidad de la infección. Los daños generados por antracnosis por *C. fruticola* se encontraba en un rango de 1.5-25mm. No se observaron lesiones hasta el séptimo día en los estadíos 2 y 6 (fig 25).

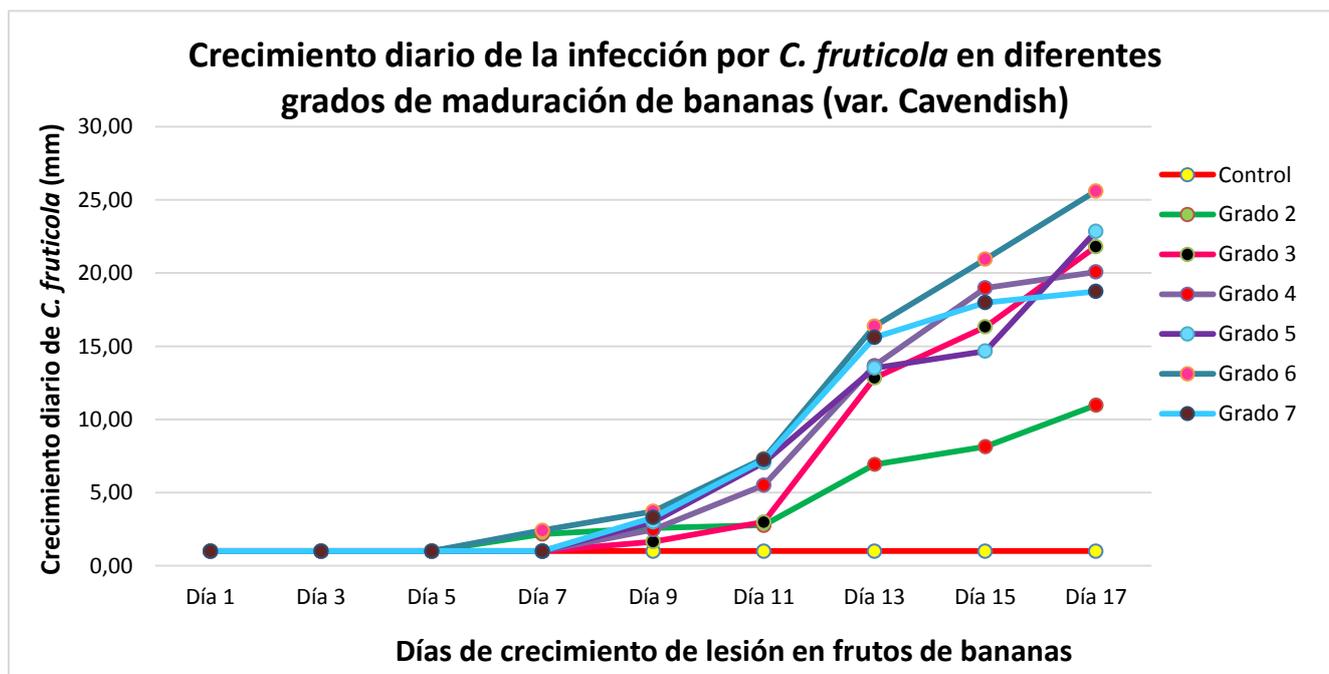


Figura 25: Análisis de patogenicidad de *C. fruticola*. Crecimiento diario del patógeno en cada grado de maduración de bananas durante diecisiete días

Las lesiones observadas en el fruto de la banana generadas por el ataque del patógeno *C. fruticola* fue altamente significativa ($p=0,011$). Sin embargo, la prueba de separación de medias Tukey, indicó que si existe una diferencia entre los tratamientos (fig 26).

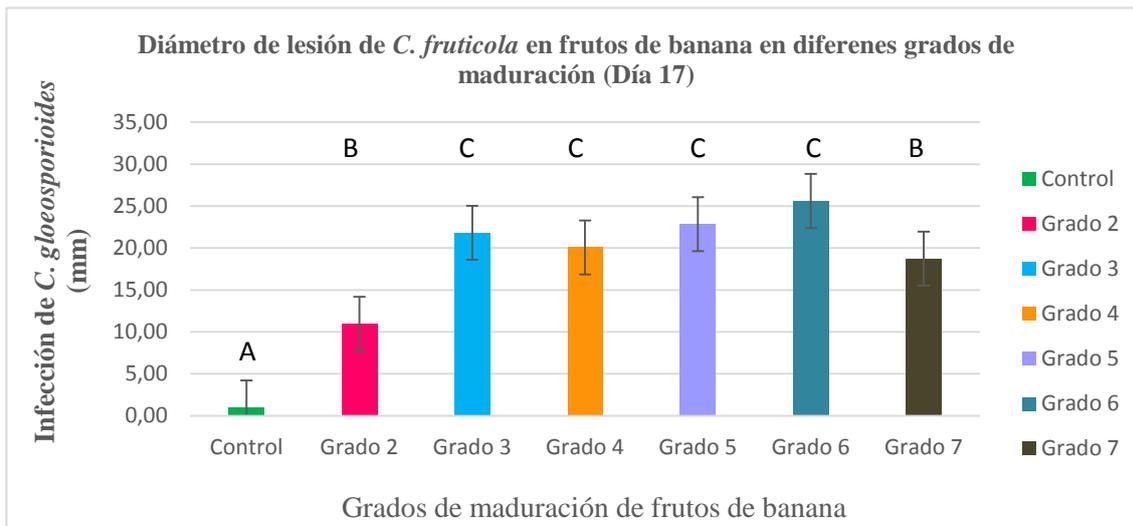


Figura 26: Gráfica del porcentaje de infección promedio de *C. fruticola* en frutos de bananas

Con el objetivo de observar la diferencia entre cada tratamiento se realizó una prueba de t-student (Anexo D). A continuación en la tabla 11 se muestran las comparaciones entre cada tratamiento.

Tabla 11: Valores p de significancia para cada comparación de tratamientos

Tratamiento	t-student p value
Grado 2 y grado 7	$p= 0,234$
Grado 2 y grado 6	$p= 0,089$
Grado 2 y grado 5	$p= 0,130$
Grado 2 y grado 4	$p= 0,199$
Grado 2 y grado 3	$p= 0,133$

Se observó que no existió ninguna diferencia significativa entre los tratamientos ya que los valores p obtenidos superan el valor $p=0,05$ referencial.

3.6 Caracterización funcional de las cepas de *Trichoderma* spp.

Para caracterizar funcionalmente las cepas de *Trichoderma* aisladas se evaluó *in vitro* el efecto de competencia y el efecto de filtrados fúngicos de estas cepas frente al fitopatógeno *C. gloeosporioides* y *C. frutícola*.

3.6.1 Evaluación *in vitro* del efecto de antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Cuando se evaluó el efecto antagónico *in vitro* de las cepas *Trichoderma* frente a *C. gloeosporioides* se determinó que 11 cepas de *Trichoderma* influyeron sobre el crecimiento *in vitro* del patógeno. El porcentaje de inhibición de crecimiento de este patógeno fue reducido entre un 50% a 80 % en comparación con el control (Fig. 27). Los datos fueron obtenidos a partir de la fórmula del porcentaje de inhibición radial descrito en el capítulo de materiales y métodos.

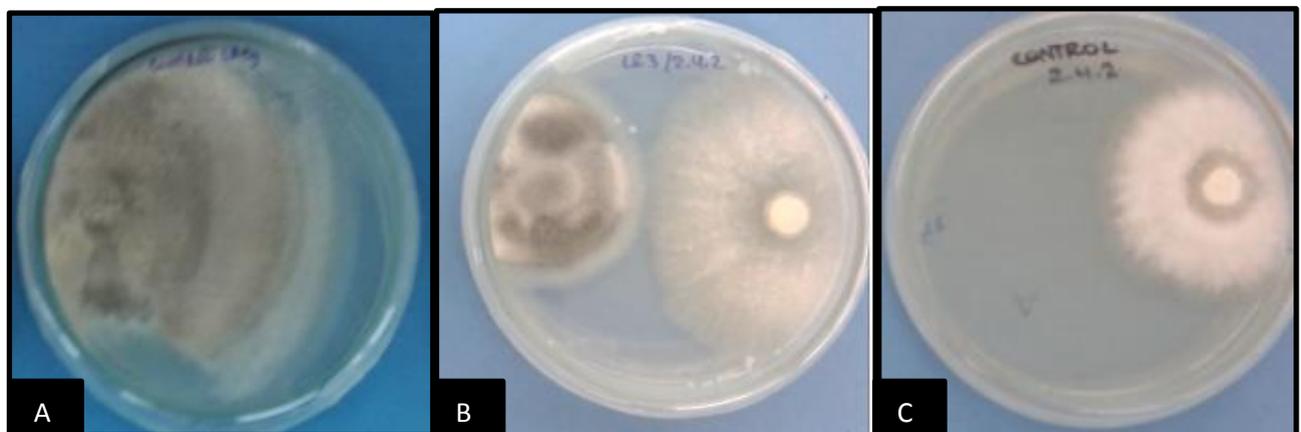


Figura 27: Cultivos duales A) Control *C. gloeosporioides*, B) Prueba de competencia, C) Control de cepa de *Trichoderma* spp., LR2.4.2SJ (Riera, 2015)

Al realizar el análisis estadístico a los siete días de crecimiento de las 11 cepas de *Trichoderma* spp., sobre el desarrollo de *C. gloeosporioides*, se determinó que existe una inhibición de crecimiento estadísticamente significativa (Fig. 28). Al medir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* frente a las cepas *Trichoderma* spp., C3.2LT, *Trichoderma* spp., GAB, *Trichoderma* spp., LR2.4.2SJ, *Trichoderma* spp., C3.4LT, *Trichoderma* spp., GBEE, *Trichoderma* spp., LR2.4SJ, *Trichoderma* spp., G2AB, *Trichoderma* spp., GSNB y *Trichoderma* spp., GAEE; exhibieron un porcentaje de inhibición del 70% a 80% en comparación con el control que presenta 100%.

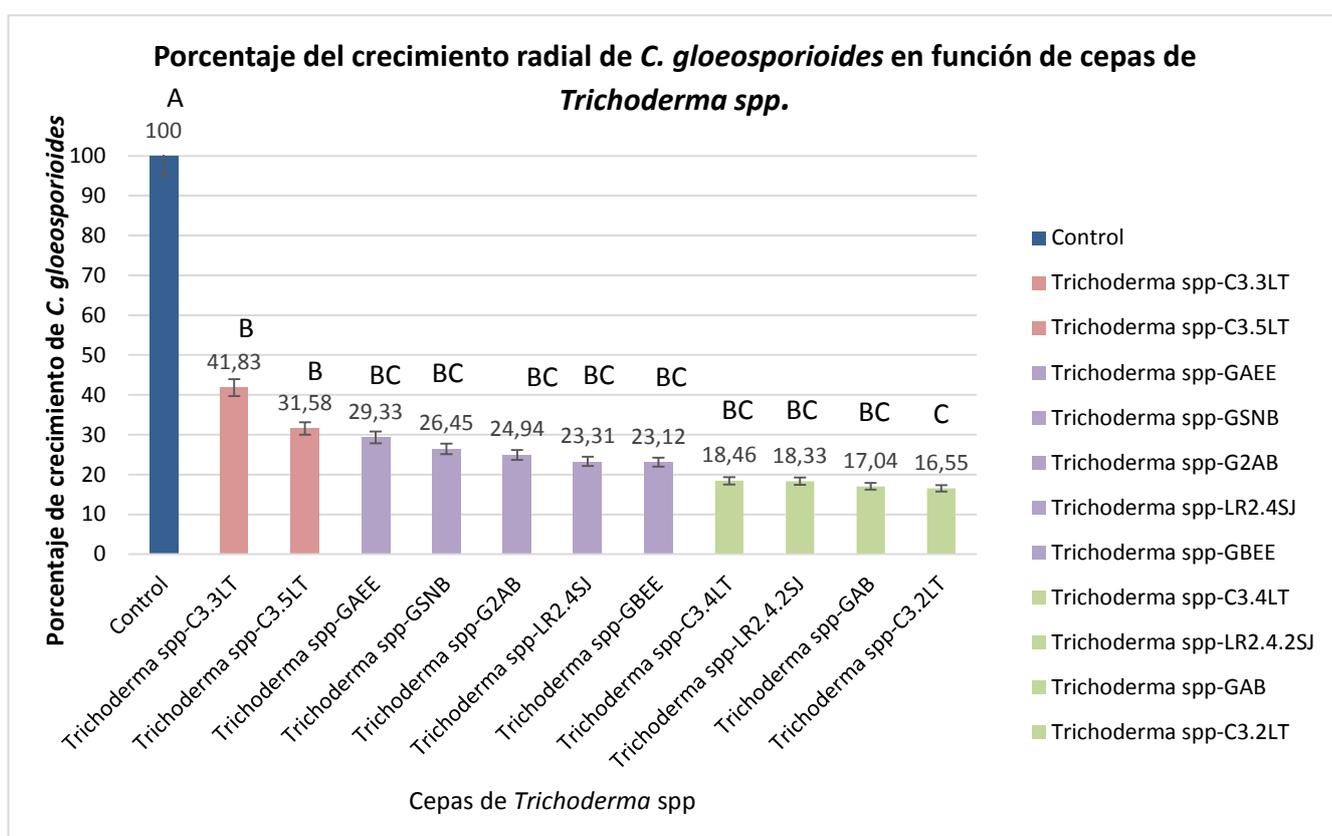


Figura 28: Gráfica del efecto antagonico mediante la prueba de competencia con las cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos de bananeras de la costa del Ecuador.

En base a los resultados obtenidos, se realizó una tabla cualitativa (tabla 12), donde se muestra con mayor claridad el efecto de *Trichoderma* en inhibir el crecimiento radial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Se agrupó a los 11 tratamientos en tres grupos de inhibición y se logró identificar a las cepas representativas.

Tabla 12: Valoración de cepas de *Trichoderma* spp.

RANGOS	VALORACIÓN
>50% a < 69%	Menor inhibición
>70% a <77%	Mediana inhibición
>80%	Mayor inhibición

En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos de la agrupación de las cepas según la escala cualitativa. Las cepas de *Trichoderma* spp., C3.2LT, *Trichoderma* spp., GAB, *Trichoderma* spp., LR2.4.2SJ, *Trichoderma* spp., C3.4LT, *Trichoderma* spp., GBEE, *Trichoderma* spp., LR2.4SJ, *Trichoderma* spp., G2AB, *Trichoderma* spp., GSNB y *Trichoderma* spp., GAEE, se encuentran dentro de los grupos de mediana y mayor inhibición sobre el crecimiento radial del patógeno.

Tabla 13: Evaluación del efecto antagónico de las cepas *Trichoderma* spp., frente a *Colletotrichum gloeosporioides*.

Nomenclatura		% Crecimiento <i>C.gloeosporioides</i>	% Inhibición	Grupos de inhibición	Cobertura total de la caja petri
CONTROL	CONTROL	100	0	NINGUNA	0
Trichoderma spp	C3.3LT	41,83	58,17	MENOR	2/4
Trichoderma spp	C3.5LT	31,58	68,42	MENOR	2/4
Trichoderma spp	GAEE	29,33	70,67	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	GSNB	26,46	73,55	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	G2AB	24,94	75,06	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	LR2.4SJ	23,31	76,69	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	GBEE	23,12	76,88	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	C3.4LT	18,46	81,54	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	LR2.4.2SJ	18,33	81,67	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	GAB	17,04	82,96	MAYOR	4/4
Trichoderma spp	C3.2LT	16,55	83,45	MAYOR	4/4

Durante la interacción de las cepas *Trichoderma* spp., frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, se observó varios mecanismos de acción que influyeron directamente sobre el crecimiento del patógeno. Se identificó que determinadas especies de *Trichoderma* pueden crecer sobre las colonias del patógeno, es decir, ésta lo enrosca a través de sus hifas apresándolo por la interacción que existe entre las moléculas de la pared de celular del patógeno y del antagonista, luego libera gran cantidad de moléculas antibióticas y enzimas que degradan la pared celular para penetrar al interior de las hifas del patógeno (Harman et al., 2004). Por otra parte, se conoce que algunas *Trichodermas* se caracterizan por la producción de metabolitos y moléculas con actividad antibiótica que liberan al medio para detener el desarrollo de los patógenos. Macroscópicamente se pudo observar que en las zonas de interacción de una cepa de *Trichoderma C3.4LT* con *Colectotrichum gloeosporioides*, eran visibles franjas libre de esporulación en donde existió una coloración amarilla característica del fenómeno de Antibiosis (Sánchez,

2009) (Fig.29). Por este motivo, se evaluó en un posterior bioensayo, el efecto fungistático *in vitro* de las 11 cepas de *Trichoderma* aisladas.



Figura 29: Antibiosis de la cepa de *Trichoderma* C3.4LT sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Riera, 2015)

3.6.2 Evaluación de filtrados fúngicos de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Se determinó que el crecimiento radial del fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* en cajas Petri con medio PDA con una concentración del 40% de los filtrados fúngicos producidos por las cepas de *Trichoderma* fue el óptimo. El crecimiento del fitopatógeno fue inhibido sobre un 50% por 11 cepas de *Trichoderma* spp.; siendo la cepa *Trichoderma* G2AB la que presentó el mayor porcentaje de inhibición correspondiente al 57.79% (figura 30 y 31).

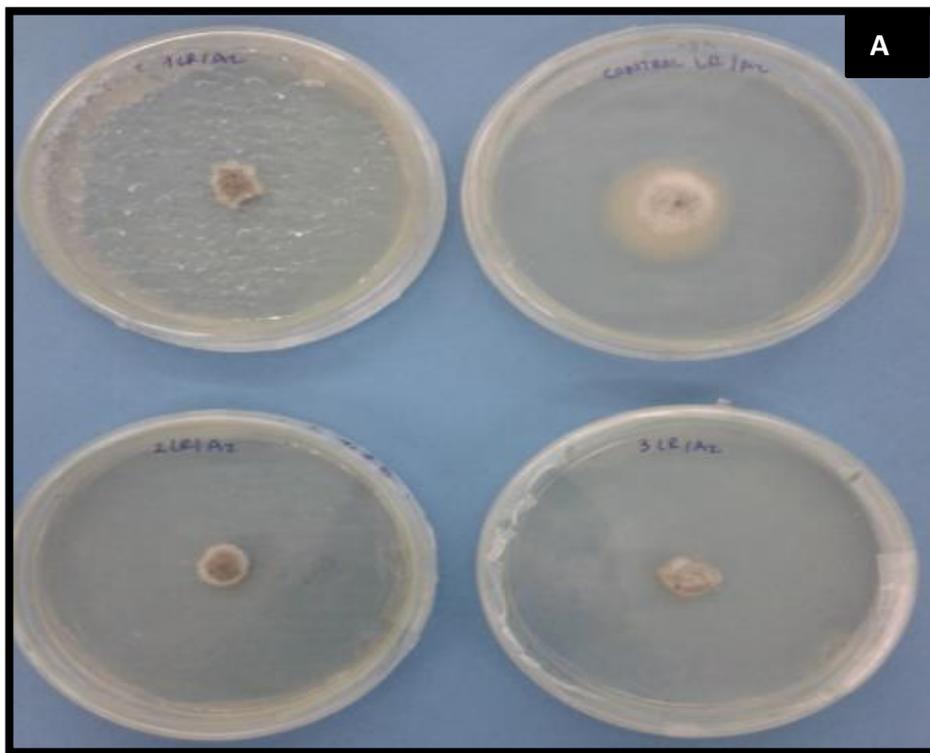


Figura 30: Evaluación de Filtrados de cepas A) *Trichoderma* spp., G2AB (Riera, 2015)

Al realizar el análisis estadístico a las 168 horas del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* bajo la aplicación de los extractos fúngicos, se determinó la existencia de 11 grupos estadísticamente significativos como se muestra en la figura 31. Cuando *Colletotrichum gloeosporioides*, crece bajo la influencia de las cepas *Trichoderma* spp., G2AB, *Trichoderma* spp., C3.4LT, *Trichoderma* spp., C3.5LT, *Trichoderma* spp., GAEE, *Trichoderma* spp., C3.2LT, *Trichoderma* spp., C3.3LT, *Trichoderma* spp., LR2.4SJ, *Trichoderma* spp., GAB, *Trichoderma* spp., LR2.4.2SJ, *Trichoderma* spp., GBEE, *Trichoderma* spp., GSNB; el crecimiento del patógeno disminuye significativamente reduciéndose en un 30% y 58 % en comparación con el control que presenta 100% de crecimiento.

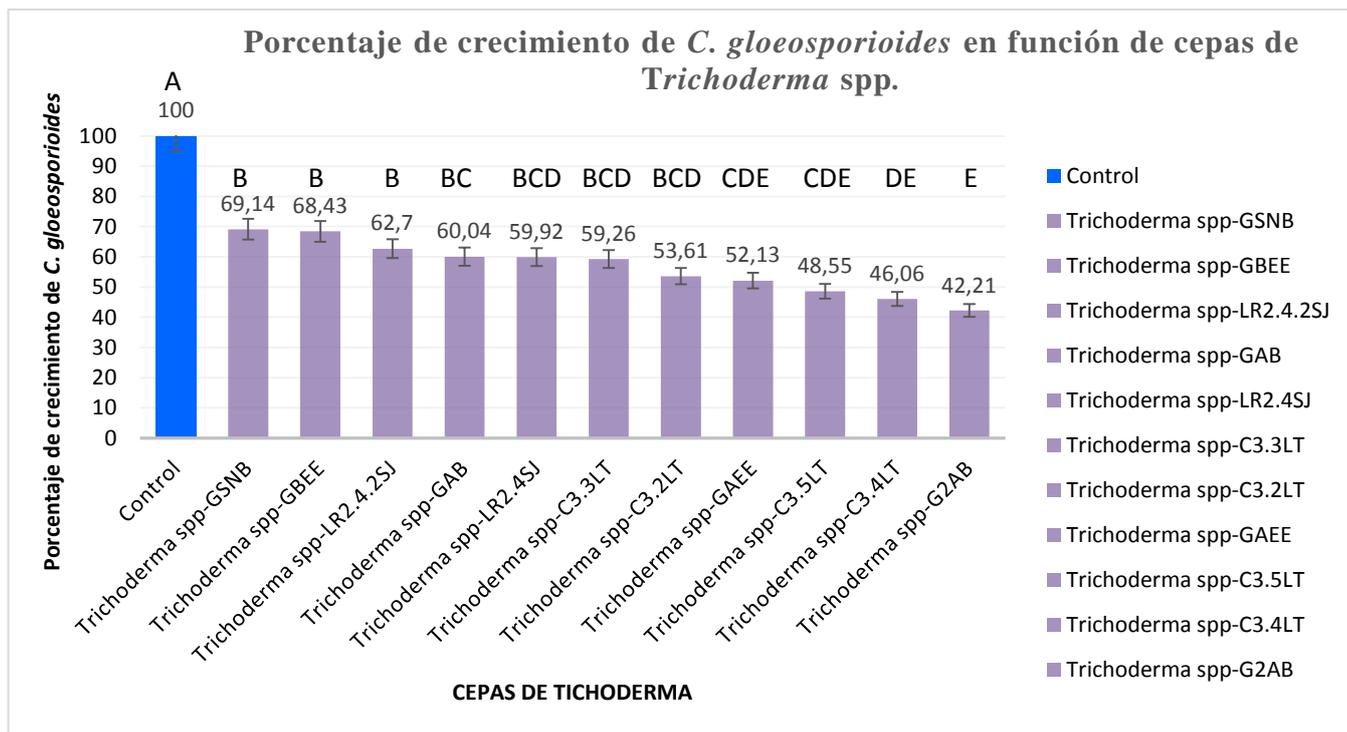


Figura 31: Gráfica del efecto antagónico mediante la prueba de antibiosis con las cepas de *Trichoderma* spp, aisladas de suelos de bananeras de la costa del Ecuador.

En base a los resultados obtenidos, se realizó una tabla cualitativa (tabla 14), se muestra con mayor claridad el efecto de *Trichoderma* en inhibir el crecimiento radial de *Colletotrichum gloeosporioides*. Se agrupó a los 11 tratamientos en tres grupos de inhibición.

Tabla 14: Valoración de cepas de *Trichoderma* spp.

RANGOS	VALORACIÓN
>30% a < 40%	Menor inhibición
>40% a < 48%	Mediana inhibición
>50%	Mayor inhibición

En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos de la agrupación de las cepas según la escala cualitativa.

Tabla 15: Evaluación del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*, bajo el efecto de los filtrados fúngicos de las cepas *Trichoderma* spp.

Nomenclatura		% Crecimiento <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	% Inhibición	Grupos inhibición	de
CONTROL	CONTROL	100	0	NINGUNA	
<i>Trichoderma</i> spp	G2AB	69.14	30.86	MENOR	
<i>Trichoderma</i> spp	C3.4LT	68.43	31.57	MENOR	
<i>Trichoderma</i> spp	C3.5LT	32.70	37.30	MENOR	
<i>Trichoderma</i> spp	GAEE	60.04	39.96	MENOR	
<i>Trichoderma</i> spp	C3.2LT	59.92	40.08	MEDIANA	
<i>Trichoderma</i> spp	C3.3LT	59,26	40,74	MEDIANA	
<i>Trichoderma</i> spp	LR2.4SJ	53.61	46.39	MEDIANA	
<i>Trichoderma</i> spp	GAB	52.13	47.87	MEDIANA	
<i>Trichoderma</i> spp	LR2.4.2SJ	48.55	51.45	MAYOR	
<i>Trichoderma</i> spp	GBEE	46.06	53.94	MAYOR	
<i>Trichoderma</i> spp	GSNB	42.21	57.79	MAYOR	

3.6.3 Evaluación *in vitro* del efecto de antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp, sobre el crecimiento de *Colletotrichum frutícola*.

Cuando se evaluó el efecto antagónico *in vitro* de las cepas *Trichoderma* frente a *C. frutícola*, de igual manera, se determinó que 11 cepas de *Trichoderma* influyeron sobre el crecimiento *in vitro* del patógeno. El porcentaje de inhibición de crecimiento de este patógeno fue reducido entre un 20% a 60 % en comparación con el control (Fig. 32).

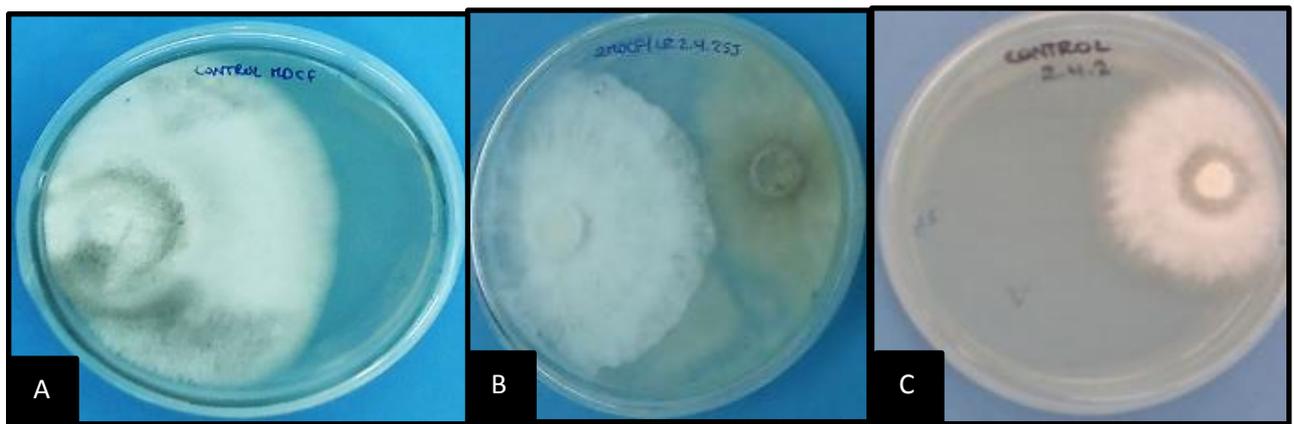


Figura 32: Cultivos duales A) Control *C. fruticola*, B) Prueba de competencia, C) Control de cepa de *Trichoderma* spp., LR2.4.2SJ

Al realizar el análisis estadístico a los siete días de crecimiento de las 11 cepas de *Trichoderma* spp., sobre el desarrollo de *C. fruticola*, los resultados fueron estadísticamente significativas al inhibir el crecimiento del patógeno (Fig. 33). Al medir el crecimiento de *Colletotrichum fruticola* frente a las cepas *Trichoderma* spp., C3.4LT, *Trichoderma* spp., LR2.4.2SJ, *Trichoderma* spp., GSNB, *Trichoderma* spp., C3.2LT, *Trichoderma* spp., GAEE y *Trichoderma* spp., C3.3LT, *Trichoderma* spp., LR2.4.SJ, *Trichoderma* spp., GBEE exhibieron un porcentaje de inhibición del 50 y 60% en comparación con el control que presenta 100% de inhibición.

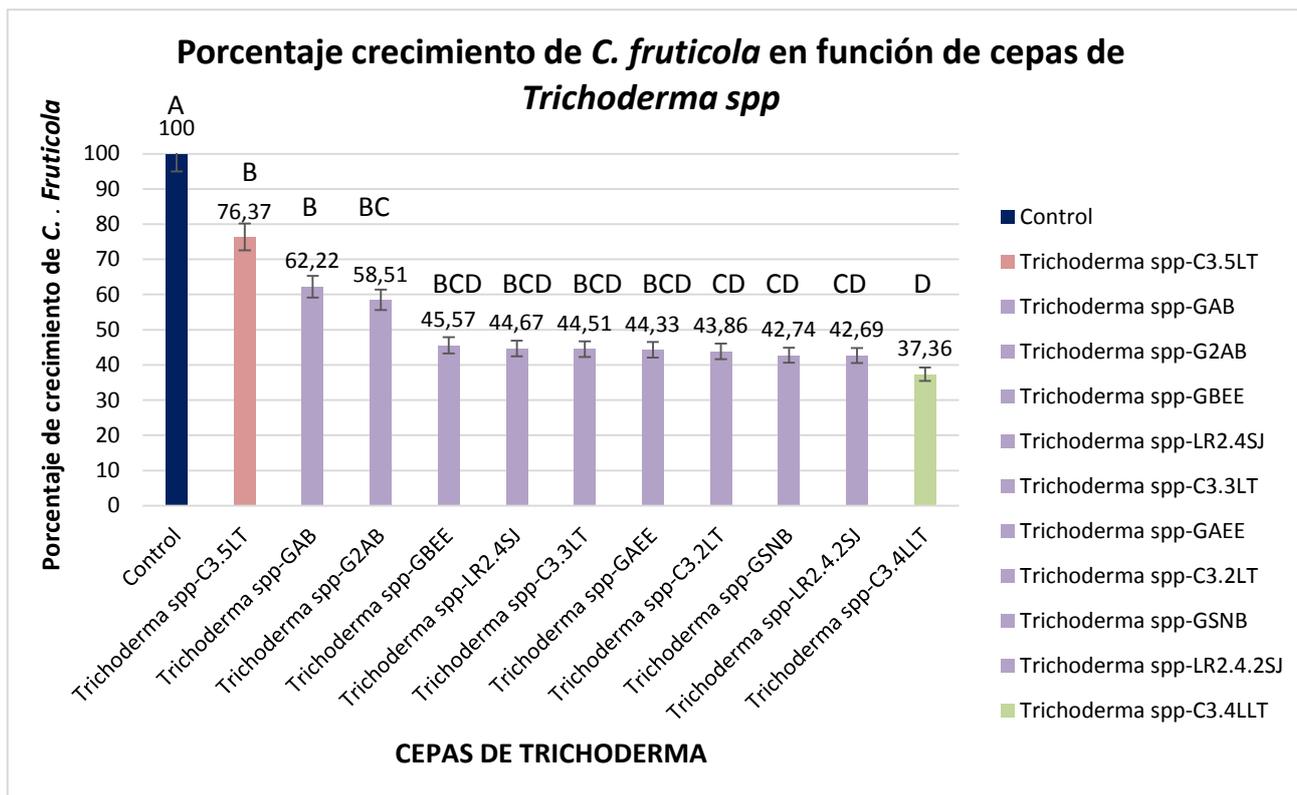


Figura 33: Gráfica del efecto antagónico mediante prueba de competencia con las cepas de *Trichoderma* aisladas de suelos de bananeras de la costa del Ecuador.

En base a los resultados obtenidos, se realizó una tabla cualitativa (tabla16), dónde se muestra con mayor claridad el efecto de *Trichoderma* en inhibir el crecimiento radial de *Colletotrichum fruticola*. Se agrupó a los 11 tratamientos en tres grupos y se logró identificar a las cepas representativas.

Tabla 16: Valoración de cepas de *Trichoderma* spp.

RANGOS	VALORACIÓN
>20%	Menor inhibición
>41% a <58%	Mediana inhibición
>60%	Mayor inhibición

En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos de la agrupación de las cepas según la escala cualitativa. La cepa de *Trichoderma* spp- C3.5LT, es la única que se encuentran dentro del grupo de menor inhibición sobre el crecimiento radial del patógeno.

Tabla 17: Evaluación del efecto antagónico de las cepas *Trichoderma* spp., frente a *Colletotrichum fruticola*.

Nomenclatura		% Crecimiento <i>C. fruticolas</i>	% Inhibición	Grupos de inhibición	Cobertura total de la caja petri
CONTROL	CONTROL	100	0	NINGUNA	0
Trichoderma spp	C3.5LT	76,37	23,63	MENOR	2/4
Trichoderma spp	GAB	62,22	37,78	MEDIANA	2/4
Trichoderma spp	G2AB	58,51	41,49	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	GBEE	45,57	54,53	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	LR2.4SJ	44,67	55,33	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	C3.3LT	44,51	55,49	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	GAEE	44,33	55,67	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	C3.2LT	43,86	56,14	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	GSNB	42,74	57,26	MEDIANA	3/4
Trichoderma spp	LR2.4.2SJ	42,69	57,31	MEDIANA	4/4
Trichoderma spp	C3.4LT	37,36	62,64	MAYOR	4/4

De igual manera como el antagonismo con *C. gloeosporioides*, la interacción de las cepas *Trichoderma* spp., frente a *Colletotrichum fruticola*, exhibió varios mecanismos de acción que influyeron directamente sobre el crecimiento del patógeno. Se identificó que determinadas especies de *Trichoderma* pueden actuar usar el mecanismo de micoparasitismo creando colonias sobre el patógeno (Harman et al., 2004). Por otra parte, se conoce que algunas *Trichodermas* se caracterizan por la producción de metabolitos y moléculas con actividad antibiótica que liberan al medio para detener el desarrollo de los patógenos. Así fue el caso de *Trichoderma* C3.4LT con *Colletotrichum fruticola*, se observó una coloración amarillenta de esta *Trichoderma* durante su crecimiento.

3.6.4 Evaluación de filtrados fúngicos de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento de *Colletotrichum fruticola*.

Se determinó que el crecimiento radial del fitopatógeno *Colletotrichum fruticola* en cajas Petri con medio PDA con una concentración del 40% de los filtrados fúngicos producidos por las cepas de *Trichoderma* fue el óptimo. El crecimiento del fitopatógeno fue inhibido sobre un 20% a 50% por 11 cepas de *Trichoderma* spp.; siendo la cepa *Trichoderma* LR2.4SJ la que presentó el mayor porcentaje de inhibición correspondiente al 54.02% (figura 34 y 35).

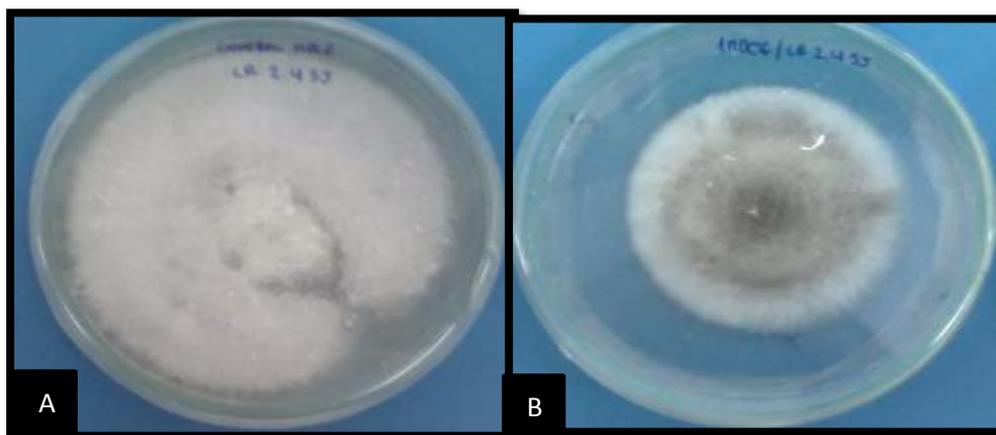


Figura 34: Análisis de antibiosis. A) Control del crecimiento de *C. fruticola* en medio PDA. B) Crecimiento de *C. fruticola* en medio PDA + 40% de metabolitos producidos por la *Trichoderma* spp., LR2.4SJ

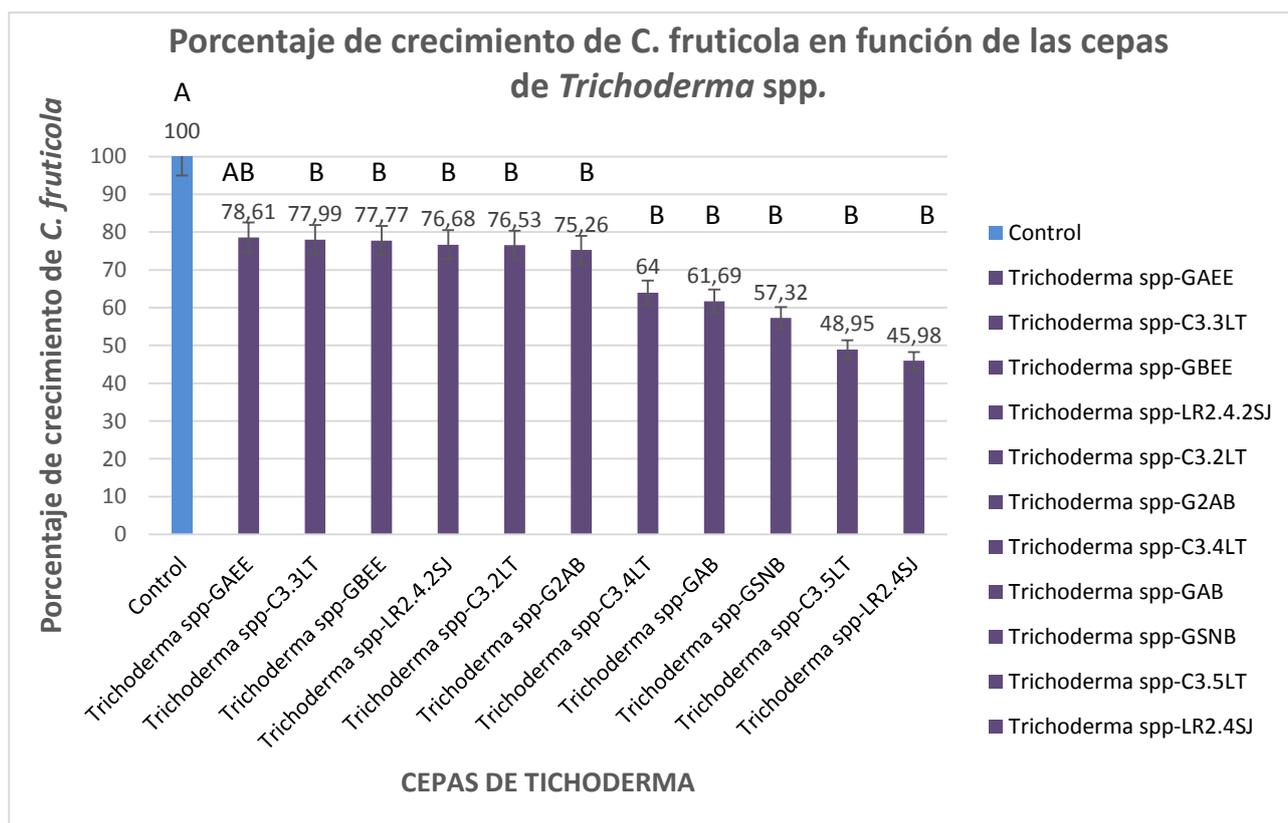


Figura 35: Gráfica del efecto antagónico mediante la prueba de antibiosis con las cepas de *Trichoderma* spp, aisladas de suelos de bananeras de la costa del Ecuador.

En base a los resultados obtenidos, se realizó una tabla cualitativa (tabla 18), dónde se muestra con mayor claridad el efecto de *Trichoderma* en inhibir el crecimiento radial de *Colletotrichum fruticola*. Finalmente, se agrupó a los 11 cepas de *Trichoderma* spp, en tres grupos de significancia.

Tabla 18: Valoración de cepas de *Trichoderma* spp

RANGOS	VALORACIÓN
>20% a <25%	Menor inhibición
>46% a <50%	Mediana inhibición
>50%	Mayor inhibición

En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos de la agrupación de las cepas según la escala cualitativa.

Tabla 19: Evaluación del crecimiento de *Colletotrichum fruticola*, bajo el efecto de los filtrados fúngicos de las cepas *Trichoderma* spp.

Nomenclatura		% Crecimiento <i>Colletotrichum fruticola</i>	% Inhibición	Grupos inhibición de
CONTROL	CONTROL	100	0	NINGUNA
Trichoderma spp	LR2.4SJ	45,98	54,02	MAYOR
Trichoderma spp	C3.5LT	48,95	51,05	MAYOR
Trichoderma spp	GSNB	57,32	42,68	MEDIANA
Trichoderma spp	GAB	61,69	38,31	MEDIANA
Trichoderma spp	C3.4LT	64,00	36,00	MEDIANA
Trichoderma spp	G2AB	75,26	24,74	MENOR
Trichoderma spp	C3.2LT	76,53	23,47	MENOR
Trichoderma spp	LR2.4.2SJ	76,68	23,32	MENOR
Trichoderma spp	GBEE	77,77	22,23	MENOR
Trichoderma spp	C3.3LT	77,99	22,01	MENOR
Trichoderma spp	GAEE	78,61	21,39	MENOR

Todos los resultados obtenidos del análisis de los bioensayos, tanto de antagonismo directo como la evaluación del efecto de los filtrados fúngicos, demuestran que las cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de fincas bananeras de la región costa del Ecuador se comportan como excelentes hongos antagonistas sobre el desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola*, hongos fitopatógenos causante de antracnosis en banano var Cavendish.

DISCUSIÓN

Trichoderma spp., es un agente microbiológico muy utilizado dentro del control biológico hace varios años. Especialmente, estos hongos son de gran utilidad para el manejo de plagas debido a sus múltiples mecanismos de acción, por su fácil aislamiento, reproducción y aplicación a pequeña y grande escala en diferentes cultivos (Bettiol & Morandi, 2009).

Se han reportado varias afecciones microbiológicas que producen daños considerables en el banano. Entre los fitopatógenos reportados se encuentran especies de *Colletotrichum* spp, un hongo causante de antracnosis a una amplia gama de frutas. Un hallazgo novedoso de la ejecución de esta investigación fue la descripción de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum frutícola* como patógeno del banano var. Cavendish. Estos hongos fueron aislados a partir de hojas de banano infectadas, es decir, se encontraron de manera ocasional asociados con las lesiones generadas por *Mycosphaerella fijiensis*, hongo fitopatógeno causante de la sigatoka negra en banano. En adición, *Colletotrichum* puede encontrarse en un estado latente antes de generar daños (Photita et al., 2004). La diseminación elevada de la enfermedad ocurre bajo altas temperaturas y alta humedad relativa. El índice de infección por antracnosis se incrementa una vez que la fruta maduró, deteriorando su calidad de comercialización y vida en percha (Intan & Suzianti, 2013).

En este estudio se evaluó la capacidad de infección de *C. gloeosporioides* y *C. frutícola* en banana. En las dos especies, existió una recurrencia de lesiones, sin embargo al someter los datos al análisis de varianza, se obtienen coeficientes de varianza muy altos, exceden el 100%, esto ocurrió ya que, en especial a *C. frutícola*, se

pudo observar que fue necesario la maduración de la fruta para que inicie el ataque patógeno; es así como no hasta el séptimo día la sintomatología de antracnosis se hizo notoria. El diámetro de infección desde el primer día hasta el quinto día fue igual a 1mm. De igual manera, dentro de la prueba de separación de medias, todos los tratamientos (grados de maduración) fueron estadísticamente iguales.

Con el objetivo de observar que especie de *Colletotrichum* tenía un mayor porcentaje de infección y deterioro en bananas se realizó un ensayo de patogenicidad en donde se hizo una suspensión de esporas, tanto de *C. gloeosporioides* como de *C. frutícola*, luego se inyectaron 5ul de esporas de cada hongo en bananas var Cavendish respectivamente. Finalmente, se presenció que la infección de *C. frutícola* no fue estadísticamente significativa ya que ésta fue más lenta, tal vez se dio a partir de que se obtuvo una menor concentración de esporas (470 000esporas/ml), lo que significa que se inocularon las bananas con 2350 esporas. Adicionalmente, como ya fue mencionado anteriormente, *C. frutícola* presentó un nivel de infección alto conforme la fruta maduraba. Por el contrario, la solución de esporas conseguida con el fitopatógeno *C. gloeosporioides* era de 540 000 esporas/ml, inoculando a las bananas con un número mayor de esporas (2700) lo cual resultó en una infección más rápida y esta especie demostró ser menos sensible al grado de madurez de la banana, es decir, infectó las bananas independientemente de su grado de maduración.

Respecto al análisis de patogenicidad, se inocularon con el fitopatógeno *Colletotrichum* spp, bananas var Cavendish. De tres cepas de *Colletotrichum* aisladas (Los Ríos; *Colletotrichum gloeosporioides* strain JS12, Los Ríos, Producvista D; *Colletotrichum frutícola* Isolate OCC97 y Los Ríos, Megaunión D; *Colletotrichum frutícola* Isolate R002b) se

utilizó solo una cepa de *C. gloeosporioides* (strain JS12) y una cepa de *C. fruticola* (Isolate R002b) puesto que se trataba de comprobar si el género *Colletotrichum* representaba un problema en la fruto de la banana, más no fue el objetivo analizar la agresividad de cada cepa. De esta forma, se comprobó que tanto *C. gloeosporioides* como *C. fruticola* se desarrollaron en bananas maduras con mayor rapidez, generando lesiones comunes de la antracnosis.

Por otra parte, la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* y *C. fruticola* por parte de los metabolitos secundarios producidos en el crecimiento *in vitro* de las 11 cepas de *Trichoderma* spp., demostraron que una concentración del 40% fue óptimo para reducir considerablemente el desarrollo del patógeno lo cual fue el objetivo. Sin embargo, se necesita probar con otras concentraciones de metabolitos (1%, 5%, 10%) con el fin de determinar cuáles cepas se especializan en la segregación de dichos "antifúngicos". Los resultados obtenidos coinciden con un estudio previo con cepas de *Trichoderma* spp., de la región sierra de Ecuador elaborado por Muñoz (2012).

Para la amplificación de las regiones ITS, fue primordial la optimización del protocolo de PCR, este consiste en una amplificación de 35 ciclos en donde el primer ciclo se utiliza como molde una secuencia de dsDNA, las dos hebras se desnaturalizan por el calor mientras que los primers hibridan con sus respectivas secuencias en dirección 5' a 3'. La Taq DNA polimerasa inicia la secuenciación en 3' en cada extremo del primer lo cual origina nuevos sitios de unión para los primers. El resultado neto después del primer ciclo son dos copias de diferente longitud de DNA, de tal forma que al final de todos los ciclos se obtiene una acumulación de estos productos cortos. En adición, la temperatura de hibridación resultó ser una complicación ya que fue necesario su ajuste dependiendo de la complejidad genética. Una mayor complejidad favorece al annealing inespecífico y bajo condiciones no muy estrictas, esta baja

especificidad puede ocasionar la amplificación de productos inespecíficos que se exhiben en el gel de agarosa como bandas de pesos moleculares superiores o inferiores a los esperados, incluso se puede observar un total barrido el cual indica que ningún producto fue amplificado. (Cultek, 2006).

En cuanto a la caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum frutícola*, una buena calidad de ADN fue primordial, puesto que durante el primer envío de muestras, los resultados obtenidos no fueron los deseados. Las muestras no pudieron ser secuenciadas debido a que la calidad de estas era mala, el ADN pudo estar contaminada con restos de fenol y otras sustancias que no se degradaron durante la extracción de del material genético. Para que una muestra de ADN tenga una calidad óptima para su secuenciación, se necesita que la integridad, pureza y concentración se encuentren dentro de los parámetros de absorbancia establecidos. La pureza de ADN a una absorbancia de 260/280nm tiene en rango que cumplir, este va de 1.8-2, si la muestra supera estos valores entonces se asume que está contaminada por resto de proteínas o fenoles los cuales pueden ser absorbidos en este rango; de igual manera, dentro de la absorbancia de 230/260nm el ADN debe tener una calidad de 2-2.20, si es menor a estos valores existe la posibilidad que la muestra esté contaminada (Desjardins & Conklin, 2010).

Finalmente, este estudio permitió conseguir datos significativos que explican las pérdidas de la fruta (banano) que se comercializa a nivel nacional e impide su exportación al no cumplir con las normas de calidad. Inicialmente, el hongo *Colletotrichum* fue aislado a partir de hojas que presentaban lesiones causadas por *Mycosphaerella*, sin embargo, este no representa ser patógenos de las hojas de banano

por lo cual se ha reportado que *Colletotrichum* puede estar de forma endófito en las hojas de banano, pero cuando encuentre una situación adecuada para su infección se desata su patogenicidad (Photita et al., 2004). Es así como se observó que *Colletotrichum* produjo lesiones graves en la fruta, las especies de *C. gloeosporioides* y *C. frutícola* representan ser una enfermedad en el banano maduro, generando lesiones comunes de antracnosis y deteriorando la calidad de esta fruta haciéndola inservible para su comercialización. A esta enfermedad se la necesita estudiar más a fondo siendo la primera infección en banano reportada en el Ecuador.

CONCLUSIONES

En esta investigación que dos especies patógenas del género *Colletotrichum* fueron aisladas a partir de hojas de banano fueron identificadas por sus características morfológicas macroscópicas, microscópicas y la secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S.

Se observó que el mayor índice de infección de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum fruticola* en bananas sucedió al momento en que éstas cruzaban por su estado de maduración completo e influyeron en el deterioro progresivo de la fruta en comparación con el control. Sin embargo, el crecimiento y ataque de *C. fruticola* ($p=0.011$) fue más lento en comparación a *C. gloeosporioides* ($p=0.02$), pero si es estadísticamente significativo.

De los 11 aislados de *Trichoderma* spp, provenientes de diferentes localidades, cinco corresponden a la provincia del Guayas, cuatro fueron aislados de suelos de la provincia de Cañar y finalmente, dos cepas se obtuvieron de suelos de la provincia de Los Ríos. Se pudo observar físicamente la gran variabilidad fenotípica de estos hongos sin importar su origen, incluso exhibieron diferencias fenotípicas dentro de una misma localidad.

El ensayo de competencia, con los 11 aislados de *Trichoderma* spp, las cepas del antagonista correspondiente a *Trichoderma* spp., C3.2LT y *Trichoderma* spp., GAB, pertenecientes a las provincias del Cañar y Guayas, presentaron un mayor porcentaje de inhibición con un 70-80% para *Colletotrichum gloeosporioides* y para *Colletotrichum*

frutícola tan solo la *Trichoderma* spp., C3.5LT exhibió el menor efecto antagónico con un porcentaje del 23,63%. Los metabolitos producidos por las cepas: *Trichoderma* spp., LR2.4.2SJ, *Trichoderma* spp., C3.5LT y *Trichoderma* spp., GSNB representaron un alto porcentaje de inhibición del patógeno, entre 40% y 50%. Los metabolitos de las demás cepas presentaron una inhibición entre 20% y 30%

A pesar de no conocer la caracterización molecular de las *Trichodermas* aisladas, la variabilidad genotípica de las cepas, se vio reflejado en su capacidad individual como antagonista de los fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum frutícola* ya que ciertas cepas inhibieron de mejor manera a *C. gloeosporioides* y otras cepas a *C. frutícola*

RECOMENDACIONES

De los resultados obtenidos a partir del efecto antagónico de *Trichoderma*, en especial la producción de metabolitos fue excelente para disminuir la incidencia de infección de antracnosis incluyendo en un medio de cultivo PDA un 40% de compuestos antifúngicos. Sin embargo, es necesario realizar más pruebas de antibiosis probando distintas concentraciones de metabolitos para conseguir resultados más específicos de cada una de las 11 cepas aisladas, es decir, comprobar hasta qué punto *Trichoderma* antagonista el crecimiento del patógeno.

Realizar más análisis de patogenicidad con las once cepas de *Trichoderma* spp, aisladas, utilizando diferentes hongos fitopatógenos del banano con el fin de otorgar nuevos mecanismos de control a las enfermedades que afectan al banano, como es el caso de la sigatoka negra.

Realizar otros análisis de patogenicidad con las otras cepas de *Colletotrichum* aisladas con el fin de conocer la agresividad entre cada cepa al infectar bananas.

Darle más importancia a esta investigación que concluye generando el primer reporte en el Ecuador que los hongos *C. gloeosporioides* y *C. frutícola* representa ser una enfermedad del banano. Es necesario difundir este descubrimiento con el fin de disminuir las pérdidas generadas por la antracnosis e impiden la comercialización de la fruta. Adicionalmente, se recomienda realizar más pruebas a nivel de campo y poscosecha con las cepas de *Trichoderma* spp., para observar cómo reacciona esta enfermedad.

La caracterización molecular de las cepas de *Trichoderma* aisladas de fincas bananeras de la región costa del Ecuador para conocer con certeza que especies de este

hongo funciona como biofungicida, complementando con mayor validez científica a esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anita, S., Ponmurgan, P., & Ganesh, R. (2012). Significance of secondary metabolites and enzymes secreted by *Trichoderma atroviride* isolates for the biological control of Phomopsis canker disease. *African Journal of Biotechnology*, *XI*(45), 10350-10357.
- Agrocalidad. (2013). El efecto del mancozeb en la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a fungicidas sistémicos. Extraído de:

http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/08/co_-_efecto_del_mancozeb_en_la_sensibilidad_de_mycosphaerella_fijiensis_a_fungicidas_sistemicos.pdf
- Almodóvar, W, I. (1996). Enfermedades en plantas: Organismos patógenos, identificación y diagnóstico. Colegio de Ciencias Agrícolas. UPR.
- Arauz, C. (2009). ¡Que no se le bajen las defensas a sus cultivos! *Innovak News*.
- Balcazar, C, J. (2014). Plan de exportación de banano variedad Cavendish Valery de Ecuador a Adriafruit Italia SpA. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras.
- Bastidas, O. (2015). Conteo celular con Hematocitómetro. Extraído de:
<http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/cell-count-error.htm>
- Beltrán, M.C, García, D.J. (2006). *Colletotrichum gloesporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición humana. *Investigaciones Andina*, vol. 8, núm. 13, pp. 73-80. Fundación Universitaria del Área Andina Pereira, Colombia.
<http://www.redalyc.org/pdf/2390/239017515006.pdf>
- Benito, E., Arranz, M., & Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinera*. *Iberoam Micol.*, 43-46.

- Bermúdez, A, A. (2013). Evaluación de la resistencia sistémica de *Arabidopsis thaliana* al fitopatógeno *Alternaria* spp, mediante la inoculación de *Trichoderma* spp. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Quito. Ecuador.
- Bettiol, W, Morandi, M. (2009). Biocontrol de Doenças de plantas, uso y perspectivas. EMBRAPA. Brazil.
- Blasco, G, L, Gómez, F, J. (2014). Propiedades funcionales del plátano *Musa* sp. Facultad de nutrición Xalapa. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Cañedo, V, Ames, T. (2004). Manual para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la papa. Lima. Perú
- Cárdenas, O, Silva, E, Morales, L, Ortiz, J. (2005). Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. *Biomédica* 2005; 25: 170-80. Bogotá. Colombia. Extraído de: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v25n2/v25n2a03>
- Cardoza, R, Sans, J. A, Monte, L, Gutierrez, S. (2005). *Secondary metabolites produced by Trichoderma and their importance in the biocontrol process*. En E. Mellado, & J. L. Barredo, *Microorganism for industrial enzymes and biocontrol* (págs. 1-22). Kerala, India: Reseachs Signpost.
- Canchignia, H, F, Espinoza, M, D, Benavides, G, R, Saucedo, S, G, Carranza, M, S, Cevallos, O, F. (2008). Propagación vegetativa de plátano y banano con la aplicación de benzilaminopurina (6-BAP) y ácido indolacético (AIA). *Ciencia y Tecnología* 1: 11-15. Ecuador.
- Centro de Ecogenética y Salud Ambiental. (2012). Riesgos a la salud por pesticidas en alimentos. Universidad de Washington. Washington. USA. Extraído de: https://depts.washington.edu/ceeh/downloads/FF_Pesticides_SP.pdf
- Cobos G. (2010). *Evaluación de cepas nativas de Trichoderma spp., para el control de Sigatoka negra en cultivo de banano en fase de laboratorio*. Facultad de Ciencias Agropecuarias de Santo Domingo. Escuela Superior Politécnica del Ejército.

- Comisión Nacional de Seguridad y de Salud en el Trabajo. (2008). Enfermedades Profesionales de los Agricultores. INSHT. Extraído de:
<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Instituto/Comision/GruposTrabajo/figheros/folleto%20enfermedades.pdf>
- Córdova, E, A. (2010). Guía Técnica del cultivo del plátano. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). El Salvador.
- Coto, G. R. (2007). *Conceptos introductorios a la Fitopatología*. San José: Universidad Estatal a Distancia.
- Cultek. (2006). Amplificación de ácidos nucleicos in vitro. Extraído de: www.cultek.com
- De La Torre, R. (2011). Cultivos Trópicos: cultivo de banano. Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador.
- Desjardins, P, Conklin, D. (2010). Nanodrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. Extraído de:
<http://www.jove.com/video/2565/nanodrop-microvolume-quantitation-of-nucleic-acids>
- Dahmen, H, Staub, T, Schwinn, F, J. (1982). Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology* 73: 241-246.
- Druzhinina I., Kopchinskiy A., Kubicek C. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *The Mycological Society of Japan*. 47:55–64.
- Edifarm. (2014). Plaguicidas. Extraído de:
http://www.edifarm.com.ec/edifarm_quickagro/pdfs/productos/CUSTODIA-20140825-134340.pdf
- Erazo N., (2000). *Evaluación de la curva de crecimiento, cuatro sustratos, dos métodos de esporulación, tres portadores inertes para Trichoderma spp., y su comportamiento frente a ocho fungicidas y cuatro fitopatógenos en laboratorio*. Escuela de Ingeniería Agronómica. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- Fagiani, M, J, Tapia, A, C. (2013). Ficha del cultivo del banano. Estación experimental de cultivos tropicales INTA. Yuto, Jujuy.
- FAO. (2009). *Como alimentar al mundo 2050*. Extraído de:
http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf
- FAO. (2013). *Comité de Seguridad Alimentaria Mundial*. Extraído de:
<http://www.fao.org/cfs/es/>
- FAOSTAT. (2011). *Producción de cultivos: área cosechada de plátano, raíces y tubérculos*. Extraído de: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>
- Ferraris G., (2000). Muestreo y Análisis de Suelo. Punto de Partida hacia un diagnóstico de Fertilidad. Desarrollo Rural INTA Pergamino.
- Fundación para la Innovación Agraria. (2004). *Manual de Producción y utilización de Trichoderma spp*. Centro de Educación y Tecnología. Chile. Inscripción N° 142372. I.S.B.N. 956-8363-02-5.
- García, J. (1997). *Consecuencias indeseables de los plaguicidas en el ambiente*. Agronomía Mesoamericana 8(1): 119-135. San Pedro de Montes de Oca. Costa Rica. Extraído de: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v08n01_120.pdf
- Gerdemann J. y Nicholson (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transnational British Mycological Society. 46:235-244.
- Guigón, C. Guerrero V, Vargas, F. Carvajal, E. Ávila, G. (2010). Molecular Identification of *Trichoderma* spp. Strains, in vitro Growth Rate and Antagonism against Plant Pathogen Fungi. Revista Mexicana de Fitopatología. 28: 87-96.
- Gutiérrez, A. (2010). *Esporas de hongos, Alternaria*. Extraído de:
<http://alcoy.san.gva.es/alercoy/fichas/Alternaria/Esporas%20de%20hongos-alternaria.pdf>

- Harman, G. (2006). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. *The American Phytopathological Society*(96), 190-194.
- Harman, G. Kubicek C., (1998). *Trichoderma* and *Gliocadium*. Basic biology. Taxonomy and genetics. Volume 1. Taylor & Francis UK 278p.
- Hernández, M, Margalida, A. (2008). Pesticide abuse in Europe: Effects on the Cinereous vulture (*Aegypius monachus*) population in Spain. *Ecotoxicology* Volume 17, Issue 4, pp 264-272. Extraído de Springerlink:
<http://link.springer.com/article/10.1007/s10646-008-0193-1>
- Hesperian Health Guides. (2014). Efectos a largo plazo de los plaguicidas sobre la salud. USA. Extraído de:
http://es.hesperian.org/hhg/A_Community_Guide_to_Environmental_Health:Efectos_a_largo_plazo_de_los_plaguicidas_sobre_la_salud
- Infante, D, Martínez, B, González, N, Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* v.24 n.1 La Habana ene.-abr. 2009. La Habana, Cuba
- Intan, M, A, Suzianti, I, V. (2013). First Report of *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Anthracnose of Banana (*Musa* spp.) in Malaysia. *EBSCO: Plant Disease*. Jul2013, Vol. 97 Issue 7, p991-992. 2p.
- Karam, M. A, Ramírez, G, Bustamante, L. P, Galván, J. M. (2004). Plaguicidas y salud de la población. *Ciencia Ergo Sum*, noviembre, año/vol. 11, número 003. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca. México. Extraído de:
<http://andoni.garritz.com/documentos/Lecturas.CS.%20Garritz/Contaminacion.Quimica/Plagicidas.pdf>
- Lima, N. B, Lima, W, G, Tovar, J, M, Michereff, S, J, Cámara, M, P. (2014). Comparative Epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. *Springer Link: European Journal of Plant Pathology*, Vol 141, Issue 4, pp 679- 688.

Loredo, C. Beltrám, S. Moreno, F. Casiano, M. (2007). *Riesgo a la erosión hídrica y proyección de acciones de manejo y conservación del suelo en 32 microcuencas de San Luis-Potosi*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Mexico D.F. Mexico. Extraído de:

<http://www.iec.cat/mapasols/DocuInteres/PDF/Llibre31.pdf>

Magdama F. (2010). Estudio del efecto de Bioles y cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de zonas cacaoteras, como alternativas de control de *Moniliophthora roreri*, en condiciones in vitro. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Escuela Politécnica Superior del Litoral.

Martínez, I, Villalta, R, Soto, E, Murillo, G, Guzmán, M. (2011). Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano. CORBANA: dirección de investigaciones, sección de fitopatología. Extraído de:

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

Moran M., (2008). Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Thpg 1* de *Trichoderma harzianum*. Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca

Muños, C, Vargas, E. (2006). Manejo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella Fijiensis* var. *Difformis* Morelet) en plátano cv. "Curraré" en San Carlos, Zona Norte 1. Tecnología en Marcha. Vol. 18-3.

Muñoz, J. (2012). Caracterización funcional y molecular de *Trichoderma* spp., recolectadas en fincas orgánicas de la región sierra del Ecuador. ESPE-USFQ. Quito. Ecuador

Otero, L, Aguin, O, Sainz, M. J, Mansilla, J. P. (2007). El género *Mycosphaerella* en plantaciones de *Eucalyptus* en Galicia. Patología, Bol. San. Veg. Plagas. 33. Extraído de:

http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Plagas/BSV_P_33_04_503_516.pdf

- Ozbay, N, Newman, S, E. (2004). Biochemical control with *Trichoderma spp.* with emphasis on *T. harzianum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 (4): 478-484.
- Palacios, G, Holguín, F, Benítez, F, Toledo, J. (2009). Epidemiología de la Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz., and Sacc) en mango (*Magnifera indica* L.) cv Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, Mexico. *Rev. mex. Fitopato* vol 27. no 2. Mexico.
- Peres, N, A, Kuramae, E, E, Dias, M, S, Souza, N. (2001). Identification and Characterization of *Colletotrichum spp.*, affecting fruit after harvest in Brazil. *J. Phytopathology* 150, 128-134. Berlin.
- Pérez, C, L, Saquero, M, J, Beltrán, H, J. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum sp.*, como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea sp.* *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. V, núm. 1, julio, 2003, pp. 24-35. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia
- Photita, W, Lumyong, S, Lumyong, P, McKenzie, E, Hyde, K. (2004). *Are some endophytes of Musa acuminata latent pathogens?* *Fungal Diversity* 16: 131-140,
- ProEcuador. (2015). Banano. Extraído de: www.proecuador.gob.ec
- ProEcuador. (2013). Perfil Sectorial de Agroindustria para el inversionista. Extraído de: <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2014/07/PERFIL-DE-AGRONDUSTRIA-IED2.pdf>
- Ramírez, C, Calvo, P, Tapia, A, C. (2011). Evaluación de la calidad de la fruta de banano de altura que se produce en el cantón Turrialba, Costa Rica. *InterSedes* Vol XI (20-2010). ISSN: 2215-2458.
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Galán, R. H., Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem*(89), 89-123.
- Rivera, M. E, Codina, J. C. (2000). Mecanismos de infección de los hongos fitopatógenos. Departamento de microbiología. Sierra Bermeja. Extraído de: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros36/fitopatogenos.html>

- Romero, A. O, Huerta, M, Huato, M. A, Domínguez, F, Arellano, D. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XI, núm. 2, diciembre, 2009, pp. 143-151. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia
- Ruano D, Moral L, López, C. (2003). *Estudio de temperaturas de crecimiento in vitro en aislados de Trichoderma sp. y de Rosellinia necatrix, evaluación del antagonismo mediante cultivos duales*. Instituto de Agricultura Sostenible. Congreso Mundial del Aguacate. pp. 525-529.
- Ru, Z, Di, W. (2012). *Trichoderma spp. from rhizosphere soil and their antagonism against Fusarium sambucinum*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(18).
- Salazar, E, Surga, J. (1988). *Métodos de desinfección de explantes de caña de azúcar en el cultivo in vitro*. *Caña de Azúcar*, Vol. 6(1): 105-112.
- Salazar, E, Hernández, R, Tapia, A, Gómez, L. (2012). Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* sp, aislado de banano (*Musa* spp) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agronomía Costarricense* 36(1): 53-68. ISSN:0377-9424. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Saldarriaga, A, Castaño, J, Arango, R. (2008). Caracterización del agente causante de la Antracnosis en el tomate de árbol, manzano y mora. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 32 (123):145-156, 2008. ISSN 0370-3908. Colombia.
- Sarayasi, S.R. (2012). Control biológico de plagas: Una alternativa a los insecticidas. LEISA, *Revista de Agroecología*, Vol. 28, n. 1. Extraído de:

<http://www.agriculturesnetwork.org/magazines/latin-america/28-1-insectos-y-agricultores/control-biologico-de-plagas>
- Skinner, J.A, Lewis, K.A, Bardon, K.S, Tucker, P, Catt, J.A, Chambers, B.J. (1997). *An Overview of the Environmental Impact of Agriculture in the U.K.* *Journal of Environmental Management* Volume 50, Issue 2, Pages 111–128. Extraído de:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479796901036>

Sotomayor, I. (2010). Programa Nacional del Banano y Plátano. INIAP. Extraído de:

http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com_content&view=article&id=29:banano&catid=6:programas#indice

Universidad de Granada. (2013). Prácticas Online de microbiología para farmacéuticos: Técnicas de cultivo. Aislamiento. Obtención de cultivos puros. España. Visitado en: <http://www.pomif.com/pages/practicas/bacteriologia/aislamiento>.

Verdu, G. (1986). Enfermedades producidas por hongos fitopatógenos que constituyen formas imperfectas (Deuteromicetos) de Ascomicetos. Bol. San. Veg. Plagas, 12: 237-272, 1986.

Zakaria, L, Shamsiah S, Zakaria, M, Salleh, B. (2009). Characterisation of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana. Tropical Life Sciences Research, 20(2), 119-125, 2009. Pulau Pinang, Malaysia.

ANEXOS

ANEXO A: MEDIO SELECTIVO PARA *TRICHODERMA* (TSM)

Laboratorio de Desarrollo Vegetal y Manejo Integrado

Componente	Cantidad (g/l)
Nitrato de calcio tetra hidratado	1,4
Nitrato de potasio	0,26
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0,26
Fosfato de potasio	0,12
Cloruro de calcio di hidratado	1
Ácido cítrico	0,05
Sacarosa	2
Agar (ajustar pH 6,5-7	20
Tween	1ml
Gentamicina	1 ampolleta
Captan 80	0,05
Rovral 50	0,05

ANEXO B: METODOLOGÍAS PARA AISLAMIENTO DE *TRICHODERMA* DE SUELOS ORGÁNICOS.

1. Se secó la tierra durante 3 días a temperatura ambiente sobre papel periódico.
2. Al estar seca la tierra, se homogenizó y pulverizó las muestras empleando morteros.
3. El polvo fino se filtró a través de un tejido nylon, depositando el polvo resultante en un recipiente.
4. Se utilizó el método de diluciones sucesivas. Se pesó 1 gramo de suelo, el cual fue diluido en 9 ml. de agua destilada estéril en un tubo de ensayo estéril (10-1) y se homogenizó con agitación vigorosa en un vórtex por 5 minutos. Se tomó 1 ml de la solución y se colocó a un tubo con 9 ml de agua destilada estéril (10-2). Se repitió el proceso hasta obtener una dilución de 10-3. Se agitó de forma constante por 1 minuto con un vórtex en cada paso.
5. Se tomó 0.1 ml de la dilución seleccionada y se colocó en el centro de la superficie del medio selectivo para *Trichoderma*.
6. La alícuota se la extendió por la superficie de la placa con una varilla la cual estuvo previamente esterilizada. Se aseguró una distribución homogénea por toda la superficie del medio.
7. Se cerró la caja petri con parafilm y se incubó a 28 °C durante 15 días.

ANEXO C: Metodología de la purificación de las regiones ITS del ADN ribosomal

5.8S amplificadas

1. Se colocó la columna de filtración dentro del tubo eppendorf.
2. En el centro de la membrana se depositó, 50µl del producto amplificado con 200µl de la solución buffer de unión a la membrana.
3. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Se centrifugó por 1 minuto a 10000rpm.
5. Se descartó el desecho recolectado en el tubo eppendorf.
6. Se agregó 650µl de solución buffer de lavado de la membrana con etanol, sobre la muestra que se encuentra en la columna de filtración.
7. Se centrifugó por 1min a 10000 rpm y nuevamente descartando el desecho del tubo recolector.
8. Se centrifugó nuevamente a 10000 rpm, por 3 minutos.
9. Al final se añadió 50µl de buffer de elución en la columna de filtración.
10. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos.
11. Se descartó la columna de filtración.
12. El volumen obtenido en el tubo eppendorf constituye el producto amplificado y purificado

ANEXO D: Análisis de varianza ANOVA-DCA

Utilizando el programa estadístico Minitab se muestran a continuación los análisis estadísticos utilizados para los resultados de la investigación.

1. ANOVA: Análisis de patogenicidad de *C. gloeosporioides* en frutos de bananas

Análisis de Varianza

Fuente Factor	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
	6	1328,1	221,34	6,61	0,002
Error	14	469,0	33,50		
Total	20	1797,1			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5,78809	73,90%	62,72%	41,28%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	3	1,000	0,000	(-6,167. 8,167)
Tratamiento 2	3	19,53	10,01	(12,37. 26,70)
Tratamiento 3	3	22,18	2,28	(15,01. 29,35)
Tra 4	3	21,33	3,21	(14,17. 28,50)
trat5	3	26,33	3,51	(19,17. 33,50)
trat 6	3	25,67	9,61	(18,50. 32,83)
Trat7	3	21,83	3,75	(14,67. 29,00)

Desv.Est. agrupada = 5,78809

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
trat5	3	26,33	A
trat 6	3	25,67	A
Tratamiento 3	3	22,18	A
Trat7	3	21,83	A
Tra 4	3	21,33	A
Tratamiento 2	3	19,53	A
Control	3	1,000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

2. ANOVA: Análisis de patogenicidad de *C. frutícola* en frutos de bananas

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	6	1307,3	217,88	4,35	0,011
Error	14	701,1	50,08		
Total	20	2008,4			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
7,07673	65,09%	50,13%	21,45%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	3	1,000	0,000	(-7,763. 9,763)
Grado 2	3	10,98	5,23	(2,21. 19,74)
Grado 3	3	21,81	7,49	(13,05. 30,58)
Grado 4	3	20,08	8,05	(11,32. 28,85)
Grado 5	3	22,86	8,43	(14,09. 31,62)
Grado 6	3	25,61	8,77	(16,84. 34,37)
Grado 7	3	18,75	7,38	(9,98. 27,51)

Desv.Est. agrupada = 7,07673

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Grado 6	3	25,61	A
Grado 5	3	22,86	A
Grado 3	3	21,81	A
Grado 4	3	20,08	A B
Grado 7	3	18,75	A B
Grado 2	3	10,98	A B
Control	3	1,000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

3. ANOVA: Análisis *in vitro* del antagonismo mediante la prueba de competencia de *Trichoderma* spp, contra el patógeno *C.gloeosporioides*

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	11	2737,5	248,86	20,34	0,000
Error	24	293,6	12,23		
Total	35	3031,1			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3,49773	90,31%	85,87%	78,20%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	3	57,37	0,00	(53,20. 61,54)
Cg/TRAB	3	25,857	0,229	(21,689. 30,025)
Cg/TRA2B	3	28,82	5,67	(24,66. 32,99)
Cg/TRSNB	3	29,68	2,75	(25,51. 33,84)
Cg/TRT3.2T	3	20,88	2,85	(16,71. 25,04)
Cg/TRT3.3T	3	32,11	3,70	(27,94. 36,27)
Cg/TRT3.4T	3	26,59	3,47	(22,42. 30,76)
Cg/TRT3.5T	3	31,24	4,62	(27,07. 35,41)
Cg/TRAEE	3	28,140	1,235	(23,972. 32,308)
Cg/TRBEE	3	27,34	6,29	(23,17. 31,51)
Cg/TR2.4SJ	3	26,98	2,63	(22,82. 31,15)
Cg/TR2.4.2SJ	3	25,08	1,97	(20,91. 29,24)

Desv.Est. agrupada = 3,49773

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Control	3	57,37	A
Cg/TRT3.3T	3	32,11	B
Cg/TRT3.5T	3	31,24	B
Cg/TRSNB	3	29,68	B C
Cg/TRA2B	3	28,82	B C
Cg/TRAEE	3	28,140	B C
Cg/TRBEE	3	27,34	B C
Cg/TR2.4SJ	3	26,98	B C
Cg/TRT3.4T	3	26,59	B C
Cg/TRAB	3	25,857	B C
Cg/TR2.4.2SJ	3	25,08	B C
Cg/TRT3.2T	3	20,88	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4. ANOVA: Análisis *in vitro* del antagonismo mediante la prueba de antibiosis de *Trichoderma spp*, contra el patógeno *C. gloeosporioides*.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	11	4094,3	372,21	23,57	0,000
Error	24	378,9	15,79		
Total	35	4473,3			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3,97360	91,53%	87,65%	80,94%

Medias					
Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%	
Control	3	55,27	0,00	(50,54.	60,00)
Cg/TRAB	3	18,90	1,91	(14,16.	23,63)
Cg/TRA2B	3	12,543	1,432	(7,808.	17,278)
Cg/TRSNB	3	34,90	3,19	(30,16.	39,63)
Cg/TRTAEE	3	18,35	5,11	(13,62.	23,08)
Cg/TRTBEE	3	30,883	0,426	(26,148.	35,618)
Cg/TRT3.2LT	3	34,38	3,35	(29,65.	39,11)
Cg/TRT3.3LT	3	29,65	7,97	(24,92.	34,39)
Cg/TRT3.4LT	3	17,860	1,682	(13,125.	22,595)
Cg/TRT3.5LT	3	26,343	1,624	(21,608.	31,078)
Cg/TR2.4SJ	3	29,08	5,59	(24,34.	33,81)
Cg/TR2.4.2SJ	3	27,56	5,98	(22,83.	32,29)

Desv.Est. agrupada = 3,97360

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Control	3	55,27	A
Cg/TRSNB	3	34,90	B
Cg/TRT3.2LT	3	34,38	B
Cg/TRTBEE	3	30,883	B
Cg/TRT3.3LT	3	29,65	B C
Cg/TR2.4SJ	3	29,08	B C D
Cg/TR2.4.2SJ	3	27,56	B C D
Cg/TRT3.5LT	3	26,343	B C D
Cg/TRAB	3	18,90	C D E
Cg/TRTAEE	3	18,35	C D E
Cg/TRT3.4LT	3	17,860	D E
Cg/TRA2B	3	12,543	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

5. ANOVA: Análisis *in vitro* del antagonismo mediante la prueba de competencia de *Trichoderma* spp, contra el patógeno *C. frutícola*.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	11	4786,6	435,15	23,47	0,000
Error	24	444,9	18,54		
Total	35	5231,5			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4,30564	91,50%	87,60%	80,86%

Medias					
Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%	
Control_1	3	70,80	0,00	(65,67.	75,93)
Cg/TRAB_1	3	42,333	1,159	(37,203.	47,464)
Cg/TRA2B_1	3	40,260	1,626	(35,129.	45,391)
Cg/TRSNB_1	3	30,50	3,92	(25,37.	35,63)
Cg/TRT3.2T_1	3	30,860	1,549	(25,729.	35,991)
Cg/TRT3.3T_1	3	33,10	9,90	(27,97.	38,23)
Cg/TRT3.4T_1	3	29,64	3,71	(24,51.	34,77)
Cg/TRT3.5T_1	3	33,63	6,20	(28,50.	38,76)
Cg/TRAEE_1	3	26,733	1,420	(21,603.	31,864)
Cg/TRBEE_1	3	42,66	2,85	(37,53.	47,79)
Cg/TR2.4SJ_1	3	29,49	4,78	(24,36.	34,62)
Cg/TR2.4.2SJ_1	3	29,16	4,20	(24,03.	34,29)

Desv.Est. agrupada = 4,30564

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Control_1	3	70,80	A
Cg/TRBEE_1	3	42,66	B
Cg/TRAB_1	3	42,333	B
Cg/TRA2B_1	3	40,260	B C
Cg/TRT3.5T_1	3	33,63	B C D
Cg/TRT3.3T_1	3	33,10	B C D
Cg/TRT3.2T_1	3	30,860	B C D
Cg/TRSNB_1	3	30,50	B C D
Cg/TRT3.4T_1	3	29,64	C D
Cg/TR2.4SJ_1	3	29,49	C D
Cg/TR2.4.2SJ_1	3	29,16	C D
Cg/TRAE_1	3	26,733	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

6. ANOVA: Análisis *in vitro* del antagonismo mediante la prueba de antibiosis de *Trichoderma* spp, contra el patógeno *C. frutícola*.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	11	5144	467,67	5,82	0,000
Error	24	1928	80,35		
Total	35	7073			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
8,96397	72,73%	60,24%	38,65%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	3	78,45	0,00	(67,77. 89,13)
Cg/TRAB	3	45,867	0,910	(35,185. 56,548)
Cg/TRA2B	3	35,40	3,96	(24,72. 46,08)
Cg/TRSNB	3	42,17	1,77	(31,49. 52,85)
Cg/TRTAE_1	3	54,90	2,18	(44,22. 65,58)
Cg/TRTBEE	3	43,32	11,86	(32,64. 54,00)
Cg/TRT3.2LT	3	40,210	1,544	(29,529. 50,891)
Cg/TRT3.3LT	3	35,67	13,05	(24,99. 46,35)
Cg/TRT3.4LT	3	48,6	24,3	(37,9. 59,3)
Cg/TRT3.5LT	3	41,60	3,52	(30,92. 52,28)
Cg/TR2.4SJ	3	29,59	3,22	(18,91. 40,27)
Cg/TR2.4.2SJ	3	49,97	3,49	(39,29. 60,65)

Desv.Est. agrupada = 8,96397

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Control	3	78,45	A
Cg/TRTAE	3	54,90	A B
Cg/TR2.4.2SJ	3	49,97	B
Cg/TRT3.4LT	3	48,6	B
Cg/TRAB	3	45,867	B
Cg/TRTBEE	3	43,32	B
Cg/TRSNB	3	42,17	B
Cg/TRT3.5LT	3	41,60	B
Cg/TRT3.2LT	3	40,210	B
Cg/TRT3.3LT	3	35,67	B
Cg/TRA2B	3	35,40	B
Cg/TR2.4SJ	3	29,59	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

