

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADOS

INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

*“Trichoderma spp. nativas como biocontrolador de
Mycosphaerella fijiensis, agente causal de Sigatoka negra
en banano”*

Autor:

Lizeth Valeria Calero Ocaña
Valeria Michelle Flores Lema

Director:

Dr. Darío Cruz Sarmiento

Milagro, 2024

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Nosotras, Lizeth Valeria Calero Ocaña y Valeria Michelle Flores Lema en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magíster en Biotecnología como aporte a la Línea de Investigación alimentación y nutrición de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 2024

Lizeth Valeria Calero Ocaña

060479575-7

Valeria Michelle Flores Lema

171985815-9

Aprobación del tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Darío Cruz Sarmiento** en mi calidad de director del trabajo de titulación, elaborado por Lizeth Valeria Calero Ocaña y Valeria Michelle Flores Lema, cuyo tema es “*Trichoderma* spp. nativas como biocontrolador de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de Sigatoka negra en banano”, que aporta a la Línea de Investigación Alimentación y nutrición, previo a la obtención del Grado. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 02 de agosto 2024

Dr. Darío Javier Cruz Sarmiento

110401201-6

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **BQF. CALERO OCAÑA LIZETH VALERIA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado **"TRICHODERMA SPP. NATIVAS COMO BIOCONTROLADOR DE MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS, AGENTE CAUSAL DE SIGATOKA NEGRA EN BANANO"**, las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	58.00
SUSTENTACIÓN	38.00
PROMEDIO	96.00
EQUIVALENTE	Excelente



Escanea este código QR para:
CHRISTIAN MIGUEL VILLAVICENCIO YANOS

Mgs VILLAVICENCIO YANOS CHRISTIAN MIGUEL
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Escanea este código QR para:
CESAR ANIBAL BARZOLA GAIBOR

Ing. BARZOLA GAIBOR CESAR ANIBAL
VOCAL



Escanea este código QR para:
GUSTAVO ELIAS MARTINEZ VALENZUELA

MARTINEZ VALENZUELA GUSTAVO ELIAS
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING FLORES LEMA VALERIA MICHELLE**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "TRICHODERMA SPP. NATIVAS COMO BIOCONTROLADOR DE MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS, AGENTE CAUSAL DE SIGATOKA NEGRA EN BANANO", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	58.00
SUSTENTACIÓN	39.67
PROMEDIO	97.67
EQUIVALENTE	Excelente



CHRISTIAN MIGUEL VILLAVICENCIO YANOS

Mgs VILLAVICENCIO YANOS CHRISTIAN MIGUEL
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



CESAR ANIBAL BARZOLA GAIBOR

Ing. BARZOLA GAIBOR CESAR ANIBAL
VOCAL



GUSTAVO ELIAS MARTINEZ VALENZUELA

MARTINEZ VALENZUELA GUSTAVO ELIAS
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

Queridos padres y hermano;

Por su constante apoyo, amor incondicional que me han guiado a lo largo de mi vida con buenos valores, gracias por ser siempre mi fuente de inspiración y creer en mí.

A mi hijo;

Por ser la luz de mis días y mi más grande motivación, espero que este logro sea un ejemplo de esfuerzo y dedicación, que sepas que todo es posible.

Lizeth

A mis hijos, por ser la fuerza diaria para no rendirme.

Valeria

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar gratitud a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis.

A nuestras familias por su amor y apoyo incondicional.

A nuestro Director, Dr. Darío Cruz, por su guía y valiosas sugerencias.

Gracias a todos.

Resumen

La sigatoka negra es una enfermedad altamente destructiva causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. que afecta la producción y calidad del banano con impactos económicos, sociales y ambientales significativos. La gestión y el control de esta enfermedad es crucial para la sostenibilidad de la industria bananera. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue aislar e identificar molecularmente con la región ITS-5.8S de DNArn de 10 cepas nativas de *Trichoderma* spp. y una cepa de *M. fijiensis* de varias zonas bananeras convencionales como orgánicas alrededor del País. Así mismo evaluar *in vitro* el ritmo de crecimiento radial y efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma* spp. frente a *M. fijiensis*. Todas las cepas de *Trichoderma* spp. crecieron superiormente frente al patógeno, no obstante, la cepa CCECH-Pasaje correspondiente a *Trichoderma harzianum* fue significativamente superior en crecimiento y antagonismo frente a *M. fijiensis* la cual sirve de control biológico alternativo contra sigatoka negra en cultivos de banano. En base a este estudio se incentiva a futuras investigaciones para la evaluación de otras cepas de *Trichoderma* spp. y su uso en combinación con otras prácticas de manejo integral de plagas, además de poder realizar estudios de campo para confirmar la eficacia de *Trichoderma harzianum* CCECH-Pasaje evaluar el impacto ambiental y desarrollar estrategias para optimizar su aplicación.

Palabras Clave: *Trichoderma*, sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*, biofungicida, control biológico, ITS-5.8S.

Abstract

Black sigatoka is a highly destructive disease caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. that affects banana production and quality with significant economic, social and environmental impacts. The management and control of this disease is crucial for the sustainability of the banana industry. Therefore, the objective of this research was to isolate and molecularly identify with the ITS-5.8S region of DNArn of 10 native strains of *Trichoderma* spp. and one strain of *M. fijiensis* from several conventional and organic banana zones around the country. Also to evaluate in vitro the rate of radial growth and the antagonistic effect of the strains of *Trichoderma* spp. against *M. fijiensis*. All the strains of *Trichoderma* spp. grew superiorly against the pathogen, nevertheless, the strain CCECH-Pasaje corresponding to *Trichoderma harzianum* was significantly superior in growth and antagonism against *M. fijiensis* which serves as an alternative biological control against black sigatoka in banana crops. Based on this study, future research is encouraged for the evaluation of other strains of *Trichoderma* spp. and their use in combination with other practices of integrated pest management, besides being able to carry out field studies to confirm the effectiveness of *Trichoderma harzianum* CCECH-Pasaje to evaluate the environmental impact and to develop strategies to optimize its application.

Keywords: *Trichoderma*, black sigatoka, *Mycosphaerella fijiensis*, biofungicide, biological control, ITS-5.8S.

Lista de Figuras

Ilustración 1:	Ciclo de vida del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	27
Ilustración 2:	Morfología de <i>Trichoderma</i> vista al microscopio.....	28
Ilustración 3:	Representación de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> sp...	29
Ilustración 4:	Antagonismo hiperparasitario.....	38
Ilustración 5:	Secuenciación formato Fasta.....	39
Ilustración 6:	Aislamiento e identificación de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet. a) Cultivos monospóricos y cultivos puros. b) Preparación de inóculos de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> c) <i>Mycosphaerella fijiensis</i> vista al microscopio.....	42
Ilustración 7:	Distribución por Especies de las Cepas de la Colección de Cultivos microbianos de la ESPOCH.....	43
Ilustración 8:	Crecimiento radial <i>Trichoderma</i> spp. vs <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	44
Ilustración 9:	Boxplot del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR%) de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	45
Ilustración 10:	Valores de significancia de <i>Trichoderma</i> spp. con la prueba Dunn para el porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	48
Ilustración 11:	Índice de crecimiento radial Antagonico.....	48
Ilustración 12:	Índice de crecimiento radial -Prueba de Dunn.....	49
Ilustración 13:	a) Cultivos de hongos frescos para extracción de ADN. b) Obtención de micelio fresco mediante raspa para extracción de ADN. c) Finalización de la extracción de ADN, precipitación del ácido (pellet) con isopropanol.....	50
Ilustración 14:	Cuadro de secuencias alineadas, convertidas a proteínas	59
Ilustración 15:	Árbol filogenético <i>Trichoderma</i> spp. en comparación con otras cepas.....	60
Ilustración 16:	Árbol filogenético de las 10 cepas aisladas de <i>Trichoderma</i> spp.....	61

Lista de Tablas

Tabla 1:	Operacionalización de variables independientes.....	25
Tabla 2:	Operacionalización de variables dependientes.....	25
	Códigos y localidades de recolección de muestras de suelo y vegetales de diferentes fincas bananeras para el aislamiento de 10 cepas de <i>Trichoderma</i> spp. y una de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	
Tabla 3:	Morelet.....	34
Tabla 4:	Valor de significancia de <i>Trichoderma</i> spp.....	54
Tabla 5:	Cuantificación y pureza de ADNs extraídos.....	58
Tabla 6:	Identificación molecular de <i>Trichoderma</i> spp. por secuenciación....	58

Lista de Siglas / Acrónimos

INIAP:	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
spp:	Especies
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
PIB:	Producto interno bruto
ADN:	Material que contiene información hereditaria
PCR:	Reacción en cadena de polimerasa
MEGA:	Programa para alinear secuencias
ANOVA:	Análisis de varianza
NCBI:	Centro Nacional de Información Biotecnológica
RCA:	Radio de Crecimiento Antagonista
RCP:	Radio de Crecimiento Patógeno

Lista de Abreviaturas

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

Índice / Sumario

DERECHOS DE AUTOR.....	1
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	2
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL CALIFICADOR.....	3
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTO.....	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tablas.....	9
Lista de Siglas / Acrónimos.....	10
Lista de Abreviaturas.....	11
Índice / Sumario.....	12
Introducción.....	15
Capítulo I: El problema de la investigación.....	17
1.1 Planteamiento del problema.....	17
1.2 Delimitación del problema.....	18
1.3 Formulación del problema.....	18
1.4 Preguntas de investigación.....	19
1.5 Determinación del tema.....	19
1.6 Objetivos.....	19
1.6.1 Objetivo general.....	19
1.6.2. Objetivos específicos.....	19
1.7. Hipótesis.....	19
1.8. Declaración de las variables (operacionalización).....	20
1.8.1. Variables independientes.....	20
1.8.2. Variables independientes.....	20
1.9 Justificación.....	20
1.10. Alcance y limitaciones.....	21
Capítulo II: Marco teórico referencial.....	23
2.1. ANTECEDENTES.....	23
2.2. Contenido teórico que fundamenta la investigación.....	25

2.2.1.	Generalidades del cultivo de banano.....	25
2.2.2.	Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet).....	25
2.2.3.	Generalidades de <i>Trichoderma</i> sp.....	27
2.2.4.	Agente de control biológico.....	29
2.2.5.	Problemática actual de fitopatógenos en cultivo y alternativas de control	30
2.2.6.	Interacción <i>Mycosphaerella fijiensis</i> y <i>Trichoderma</i> spp.....	30
2.2.7.	Filogenia.....	32
2.2.8.	Uso de marcadores de DNA en hongos fitopatógenos.....	33
	Capítulo III: Diseño metodológico.....	34
3.1.	Tipo y diseño de investigación.....	34
3.1.1.	Por el tipo de investigación.....	34
3.1.2.	Por el diseño de investigación.....	34
3.1.3.	Diagrama de diseño metodológico.....	34
3.2.	La población y la muestra.....	35
3.2.2.	Características de la población.....	35
3.3.3.	Delimitación de la población.....	35
3.3.	Proceso de selección de la muestra.....	35
3.4.	Determinación del ritmo de crecimiento del antagonista.....	36
3.5.	Identificación a nivel de especie.....	36
3.6.	Los métodos y las técnicas.....	37
3.3.1.	Fase de campo.....	37
3.3.2.	Fase de laboratorio.....	37
3.3.3.	Determinación del ritmo de crecimiento del antagonista.....	38
3.3.4.	Identificación molecular de <i>Trichoderma</i> spp.....	38
3.3.5.	Extracción de ADN.....	38
3.3.6.	Cuantificación ADN.....	39
3.3.7.	Secuenciación.....	39
3.3.8.	Pruebas de Antagonismo.....	39
3.4.	Procesamiento estadístico de la información.....	42
3.4.1	Fuente de datos.....	42
3.4.2	Programa estadístico utilizado.....	42
3.4.3.	Técnica usada en el análisis.....	42
3.4.4.	Filogenia.....	42

3.4.5.	Alcance y limitación del análisis.....	42
3.4.6.	Interpretación de resultados.....	43
Capítulo IV: Análisis e interpretación de resultados.....		45
4.1.	Aislamiento y purificación de 1 cepa de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet.....	45
4.2.	Aislamiento y purificación de las cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	45
4.3.	Análisis estadístico.....	46
4.3.1.	Ritmo de Crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp. por tratamientos.....	46
4.3.2.	Porcentaje de inhibición de crecimiento de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	47
4.3.3.	Índice de crecimiento radial del <i>Trichoderma</i>	50
4.4.	Identificación molecular de <i>Trichoderma</i> spp.....	52
4.4.1.	Cuantificación de ADN.....	52
4.5.	Identificación molecular de <i>Trichoderma</i> spp. por secuenciación.....	53
4.6.	Análisis e interpretación de los resultados de la filogenia de las 10 cepas de <i>Trichoderma</i> sp.....	62
4.6.1.	Árbol filogenético de las 10 cepas aisladas de <i>Trichoderma</i> spp.....	63
4.6.2.	Árbol filogenético para las cepas aisladas de <i>Trichoderma</i> sp.....	64
Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones.....		66
5.1.	Conclusiones.....	66
5.2.	Recomendaciones.....	66
	Bibliografía.....	68
	Anexos.....	74

Introducción

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es una de las enfermedades más devastadoras que afectan a los cultivos de banano *Musa paradisiaca* a nivel mundial. Esta enfermedad puede reducir significativamente el rendimiento de los cultivos y afectar la calidad de la —fruta. A pesar de los esfuerzos por controlar esta enfermedad, su control sigue siendo un desafío debido a la rápida propagación del hongo y la resistencia que ha desarrollado a muchos fungicidas convencionales. (Espinoza Mendoza, 1986)

La severidad de este patógeno se magnifica en un sistema agrícola como el de las Musáceas, en el cual la propagación vegetativa (reproducción asexual) y el cultivo en grandes extensiones de tierra de un cultivar genéticamente uniforme, lo hace altamente vulnerable. (Espinoza Mendoza, 1986)

La industria de producción de banano ha aumentado a nivel nacional incluso mundial debido a las características nutricionales e industriales que ofrece esta planta, por esta razón los agricultores al buscar soluciones rápidas y económicas a los problemas fitosanitarios los ha llevado al uso erróneo de productos químicos, que en lugar de mejorar sus cultivos solo causan una mayor contaminación ambiental.

Esta enfermedad se controla principalmente con la aplicación de fungicidas por medio de avionetas, helicópteros u otros medios; lo que implica hasta el 40,0% del costo total de la producción y un aumento en el grado de contaminación ambiental y daños en la salud humana.

En Ecuador, la producción de banano es la actividad agrícola más significativa para la economía del país, con una exportación anual de 4 millones 828 mil toneladas y la creación de empleo para más de un millón de familias. Estos 2,5 millones de personas, que representan aproximadamente el 17 % de la población actual, dependen de la industria bananera de una u otra manera. (INIAP 2010).

Además de ser la práctica más natural y eficaz, el uso de antagonistas para la prevención, erradicación y control de enfermedades contribuirá significativamente a la economía de los agricultores y contribuirá a la conservación y rehabilitación de los suelos en beneficio de la naturaleza y el hombre. (Espinoza Mendoza, 1986)

El hongo *Trichoderma* es uno de los agentes de biocontrol más eficaces debido a que posee una serie de mecanismos contra patógenos, no solo como microorganismo antagónico, debido a su gran capacidad de antibiosis, competencia, e hiperparasitismo frente a microorganismos, sino también como estimulador de crecimiento y desarrollo de las plantas debido a la secreción de fitohormonas y la producción de enzimas hidrolíticas. Además, tiene altas tasas de crecimiento, capacidad para adaptarse a condiciones de estrés y altas temperaturas (Andrade-Hoyos et al., 2019)

Existe una variedad de fórmulas comerciales que se basan en las especies de *Trichoderma* para combatir hongos patógenos, en su mayoría de origen en el suelo. Sin embargo, debido a las diversas condiciones ambientales de la naturaleza, estos biofungicidas pueden ser más o menos efectivos en cada región agrícola. Es por esta razón que es necesario buscar cepas nativas de *Trichoderma* que puedan controlar los hongos patógenos de plantas en las condiciones ambientales de Ecuador, así como identificar los mecanismos que se utilizan para controlarlos. (Espinoza Mendoza, 1986)

El control biológico de Sigatoka negra, mediante la utilización de *Trichoderma*, busca, aparte del control, lograr la seguridad alimentaria al proporcionar alimentos libres de compuestos tóxicos. Ello representaría una alternativa viable basada en sus características de ser eficaz contra fitopatógenos foliares y del suelo en algunos cultivos. Como antecedentes existen estudios realizados a nivel in vitro e invernadero que han evidenciado la posibilidad de su uso en el control de la enfermedad. (Espinoza Mendoza, 1986)

Capítulo I: El problema de la investigación

1.1. Planteamiento del problema

Mycosphaerella fijiensis, es la enfermedad más devastadora de los cultivos de banano a nivel mundial (Poveda, 2021), por ello en Ecuador siendo uno de los principales productores de esta plantación, la sigatoka negra es una amenaza para la producción y economía agrícola, por ellos las medidas tradicionales para el control de esta enfermedad ha incluido el uso masivo de sustancias químicas, causando consecuencias negativas en el ámbito económico, salud y medio ambiente por los residuos tóxicos.

Con este antecedente, el uso de bio controladores representa una alternativa prometedora y sostenible, siendo *Trichoderma* la más conocida por su alta acción antagonista contra algunos fitopatógenos, además de ser promotora del crecimiento de las plantas a través del mico parasitismo, productora de metabolitos antifúngicos e inducción de resistencia en el sistema de las plantas.

Sin embargo, después de revisar estudios preliminares de la potencialidad de *Trichoderma* como biocontrolador frente a *Mycosphaerella fijiensis* en cultivos de Ecuador no han sido las investigaciones muy exploradas ni documentadas, es ahí donde entra la importancia de los factores que influyen en la acción antagonista de este microorganismo, sean propios de él o del medio ambiente.

Por esta razón surge la necesidad de investigar de manera sistemática la acción antagónica de *Trichoderma* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis* en las plantas de banano bajo condiciones específicas que se dan en los cultivos ecuatorianas.

El presente estudio busca identificar cual es la cepa de *Trichoderma* más eficaz para su aplicación a la Sigatoka Negra en los cultivos, la reproducción de estos resultados contribuirá al manejo de esta enfermedad, además de contribuir a una agronomía bioamigable.

1.2. Delimitación del problema

La Sigatoka negra es la enfermedad foliar más destructiva y de mayor impacto económico en los cultivos de banano y plátano a nivel mundial, pudiendo causar pérdidas de hasta el 50% en el rendimiento si no se aplican medidas de control. El hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la enfermedad, es altamente virulento y tiene un período de incubación corto, lo que dificulta su manejo.

Debido a los problemas ambientales y de salud asociados al uso excesivo de fungicidas químicos para el control de la Sigatoka negra, se han evaluado alternativas biológicas como el uso de antagonistas naturales. *Trichoderma* spp. es un hongo saprófito que posee mecanismos de acción directa e indirecta para regular el crecimiento de hongos fitopatógenos, como competencia por nutrientes, micoparasitismo y antibiosis.

Varios estudios han demostrado el efecto antagónico in vitro e in vivo de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre *M. fijiensis*. Sin embargo, se requiere generar más información sobre la efectividad de estos biocontroladores en condiciones de campo para el manejo integrado de la Sigatoka negra.

El objetivo de esta investigación fue evaluar in vitro el efecto antagónico de diez cepas de *Trichoderma* spp. contra *Mycosphaerella fijiensis*. Estas cepas podrían utilizarse como un medio alternativo para controlar la Sigatoka negra. Para llevar a cabo una identificación molecular, se examinaron los ritmos de crecimiento radial de diez cepas nativas de *Trichoderma* spp.

1.3. Formulación del problema

Como *Mycosphaerella fijiensis* es un patógeno que ataca plantaciones de banano reduciendo la productividad de este. El uso de biocontroladores como hongos del género *Trichoderma* pueden ser efectivos contra este patógeno. Nuestro diseño evaluará 10 cepas nativas de *Trichoderma* por triplicado probándose in vitro contra *Mycosphaerella fijiensis*. El ritmo de crecimiento radial marcará la acción del porcentaje de inhibición de especies de *Trichoderma* contra el patógeno. Esperamos obtener un alto porcentaje de inhibición de todas las cepas de *Trichoderma* spp. contra

Mycosphaerella fijiensis y así promover combinados de esporas de estas cepas nativas de *Trichoderma* spp.

1.4. Preguntas de investigación

¿*Trichoderma* spp. nativas de la Costa son antagonistas en el crecimiento radial de *Mycosphaerella fijiensis*?

1.5. Determinación del tema

Trichoderma spp. es biocontrolador de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de Sigatoka negra en banano, presentando características inhibitorias permitiéndole competir con agroquímicos tóxicos.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

- Evaluar 10 cepas de *Trichoderma* spp. con efecto antagónico in vitro frente a *Mycosphaerella fijiensis*.

1.6.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a nivel molecular mediante el marcador ITS-5.8S 10 cepas de *Trichoderma* spp.
- Analizar el ritmo de crecimiento radial de las cepas antagónicas de *Trichoderma* spp. contra la cepa patógena *Mycosphaerella fijiensis*.
- Establecer el mejor porcentaje de inhibición de crecimiento para las cepas de *Trichoderma* spp. (biofungicida) contra la cepa *Mycosphaerella fijiensis*.

1.7. Hipótesis

- Hipótesis alternativa: Todas las cepas de *Trichoderma* spp. tiene efecto antagónico (biofungicida) para inhibir el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*.
- Hipótesis nula: Todas las cepas de *Trichoderma* spp. no tienen efecto antagónico (biofungicida) para inhibir el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*.

1.8. Declaración de las variables (operacionalización)

1.8.1. Variables independientes

Tabla 1: Operacionalización de variables independientes

Variable	Definición	Indicador	Escala
Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.	Incremento del tamaño de la colonia de <i>Trichoderma</i> en el medio de cultivo.	Diámetro de la colonia (mm)	Continua
Tiempo de incubación	Período durante el cual las colonias se incuban en el laboratorio.	Días	Continua

Elaborado por: Calero, L. & Flores, V. 2024

1.1.1. Variables independientes

Tabla 2: Operacionalización de variables dependientes

Variable	Definición	Indicador	Escala
Crecimiento de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Incremento del tamaño de la colonia de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en el medio de cultivo.	Diámetro de la colonia (mm)	Continua
Inhibición del crecimiento de	Reducción del tamaño de la colonia de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Porcentaje de inhibición (%)	Continua

<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	en presencia de <i>Trichoderma</i> .		
---------------------------------	--------------------------------------	--	--

Elaborado por: Calero, L. & Flores, V. 2024

1.9 Justificación

Es necesario desarrollar alternativas ecológicas y económicamente sostenibles para el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), ya que esta enfermedad es una de las principales causas de la disminución de la producción bananera en Ecuador. Estos productos de baja toxicidad y de origen orgánico a base de *Trichoderma*, además de reducir la incidencia de la enfermedad, brindan rigor y resistencia a la planta. Además de ser la práctica más natural y efectiva, el uso de antagonistas para la prevención, erradicación y control de enfermedades contribuirá significativamente a mejorar la economía de los agricultores y ayudará a la conservación y rehabilitación de los suelos en beneficio de la naturaleza y el hombre. *Trichoderma* es un agente protector del suelo. (Poveda, 2021)

En Ecuador, se cultivan 180 301 hectáreas de banano. El cultivo se enfrenta a importantes desafíos fitosanitarios como los causados por hongos y nematodos. La enfermedad foliar más limitante y destructiva de los hongos es la Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis*. (Palacios et al., 2019)

Después de todo, la sensibilidad de *M. fijiensis* a ciertas moléculas químicas ha disminuido debido a su gran plasticidad genética debido a su doble tipo de reproducción vegetativa, y la necesidad de competir en el mercado nacional e internacional con productos de alta calidad y con una menor cantidad de desechos tóxicos hacen que se busquen métodos para disminuir los daños causados por esta enfermedad. (Palacios et al., 2019)

1.10. Alcance y limitaciones

Evaluar la capacidad de *Trichoderma* spp. para inhibir el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*, un hongo patógeno que causa la enfermedad de la Sigatoka negra en el cultivo de plátano. El objetivo principal es determinar si *Trichoderma* spp. puede ser utilizado como un agente de biocontrol para combatir esta enfermedad y

reducir la necesidad de utilizar fungicidas químicos, que pueden tener efectos nocivos en el medio ambiente.

Se espera poder identificar cepas de *Trichoderma* spp. que presenten un alto grado de antagonismo contra este patógeno y que puedan ser utilizadas como agentes de control biológico.

Entre las limitaciones de esta investigación se encuentran la dificultad de reproducir las condiciones exactas del campo en un entorno de laboratorio, lo que puede afectar la validez de los resultados obtenidos. Además, el estudio se centra únicamente en el antagonismo entre *Trichoderma* spp. y *Mycosphaerella fijiensis* a nivel de laboratorio, por lo que se necesitarían pruebas adicionales en condiciones más realistas, como ensayos de campo, para validar la eficacia de *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol en la agricultura.

Otra limitación importante es la variabilidad genética tanto de *Trichoderma* spp. como de *Mycosphaerella fijiensis*, lo que puede influir en la capacidad de *Trichoderma* spp. para inhibir el crecimiento de diferentes cepas de este hongo. Por lo tanto, es necesario realizar pruebas con diferentes cepas de *Trichoderma* spp. y *Mycosphaerella fijiensis* para determinar la efectividad de esta interacción en diferentes contextos.

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1. ANTECEDENTES

En el Ecuador la producción bananera es importante para el área social y comercial, ya que representa el 2% del producto Interno Bruto, representando el empleo y beneficio para 2,5 millones de familias, aproximadamente el 6% de la población ecuatoriana. (Palacios et al., 2019)

La industria bananera es clave en el desarrollo de la economía del país, por ende, es una causa de preocupación ya que la incidencia enfermedades y plagas a causa del medio ambiente afectan el rendimiento de los cultivos de banano y su viabilidad a largo plazo como lo indica la FAO mediante un estudio de sostenibilidad y cambio climático del banano en Ecuador en el 2015. (Palacios et al., 2019)

Según esta institución los cultivos están limitados por enfermedades ya que se invierte gran cantidad de dinero en investigación y control de estas, en la mayor parte de Latinoamérica como en Ecuador las enfermedades es el principal obstáculo de producción, actualmente; las principales enfermedades en los cultivos de banano son las manchas foliares o Sigatoka, mismas que son causadas por dos tipos de patógenos conocidos como (*Mycosphaerella musicola* y *fijensis Morelet*). (Rivera-Méndez et al., 2016)

La sigatoka negra es el principal problema fitosanitario y la mayor limitante en la producción sostenible de bananas a nivel mundial, ya que repercute en el ámbito económico de las contrataciones de las fumigaciones aéreas, además que la frecuencia de las fumigaciones causa un valor negativo para el medio ambiente. (Castillo-Arévalo, n.d.)

Se puede indicar que el uso de agentes biológicos son una parte importante en la agricultura sostenible, siendo importante en la producción orgánica, ya que se aplican prácticas encaminadas al control de patógenos de forma natural. El género *Trichoderma* contiene especies que son de importancia biotecnológica. Algunas de estas se emplean como métodos de biocontrol para combatir enfermedades en las plantas, mientras que otras se emplean para fabricar enzimas y antibióticos, en la biorremediación de entornos contaminados, y como fuente de genes para la creación de plantas transgénicas. (Castillo-Arévalo, n.d.)

Por esta razón en los últimos años debido a los altos porcentajes de contaminación tanto agricultores como investigadores dirigieron sus proyectos al desarrollo de sistemas bioamigables, siendo una de las especies más usadas como ingrediente bioactivo especies del género *Trichoderma*, siendo su mecanismo de acción para combatir mediante micoparasitismo, competencia, antibiosis o inducción de resistencia.

Mecanismo de control biológico, además de contribuir al medio ambiente también logra un resultado de seguridad alimentaria, ya que se obtienen productos libres de sustancias tóxicas. Esto nos lleva a desarrollar sustancias a base de macroorganismos antagónicos, que actúen frente a las enfermedades foliares, siendo las especies de *Trichoderma* efectivos en el control biológico de enfermedades aun cuando hay epidemias, siendo una de las alternativas más viables disponibles en este sector. (Castillo-Arévalo, n.d.)

Sánchez López, V. (2006) lleva a cabo una investigación de campo descriptiva llamada "Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp. de varios ecosistemas en la región de Papaloapan, México". El objetivo de esta investigación es aislar y caracterizar las cepas de *Trichoderma* presentes tanto en ecosistemas naturales como cultivados en la Cuenca del Papaloapán. Esta investigación representa el primer paso hacia la creación de un programa de control biológico.

El trabajo de grado de Sánchez Pérez, M. (2009) en el Instituto Politécnico Nacional de México se centró en el aislamiento y caracterización molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. nativo del norte de Tamaulipas. El objetivo del trabajo de grado fue obtener aislados de *Trichoderma* spp. nativos de la región, estimar su adaptación a

las condiciones de la zona, luego determinar su especie y evaluarlos. Además, determinar si *Trichoderma* spp. sintetiza fitohormonas que están relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal o el aumento de la biomasa de las plantas. (Mexicana De Fitopatología et al., 2006)

Los primeros estudios realizados en Ecuador, en la provincia de Chimborazo, por ESPOCH y el Departamento de Sanidad Vegetal incluyen Cazco (2005) y Aimacaña (2007), que aislaron e identificaron cepas de *Trichoderma* y *Mycosphaerella fijiensis* y las probaron con resultados satisfactorios a nivel in vitro.

2.2. Contenido teórico que fundamenta la investigación

2.2.1. Generalidades del cultivo de banano

La actividad agrícola más significativa para la economía ecuatoriana es el cultivo de banano (*Musa AAA*). En 2010, Ecuador exportó 265 millones 587 mil 828 cajas de 18.14 kg, lo que equivale a alrededor de 4 millones 828 mil toneladas. Ecuador es responsable de un tercio de las exportaciones globales, lo que genera un ingreso de \$1900 millones en moneda extranjera y otros \$90 millones en impuestos al estado en la actualidad. La actividad bananera representa el 3,84 % del PIB nacional, representa el 50% del PIB agrícola y representa el 20% de las exportaciones privadas del país. Más de un millón de personas son empleadas por el cultivo de banano y sus industrias secundarias.

La superficie de siembra de 230000 hectáreas se concentra principalmente en tres provincias del litoral, Guayas, Los Ríos y El Oro, y entre otras 7 provincias (8%). El nivel de tecnificación, la zona de producción y el tamaño de la explotación son factores que están relacionados con los rendimientos. Existe tres niveles de manejo del cultivo bananero: tecnificado, semitecnificado y no tecnificado. El manejo que se implementa en cada nivel está relacionado con el rendimiento. Actualmente, el rendimiento nacional reportado es de aproximadamente 1700 cajas/ha/año, lo que es muy bajo en comparación con nuestros principales competidores, como Colombia, Costa Rica y Filipinas, que alcanzan una productividad.

2.2.2. Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet)

Es una enfermedad foliar destructiva que afecta principalmente a los bananos y los plátanos del género *Musa*. El principal problema fitopatológico en estos cultivos es el hongo *Ascomycete Mycosphaerella fijiensis* Morelet, también conocido como anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*. (Jaramillo Aguilar et al., 2017)

El ciclo de vida de *M. fijiensis* está caracterizado por dos estados: el estado perfecto y el imperfecto (Alexopoulos y Mins, 1979). Ambos estados son importantes en la infección a su hospedante. La fase asexual se presenta en el desarrollo de las primeras lesiones de la enfermedad (pizca y raya) en donde se observa la presencia de un número relativamente bajo de conidióforos (estructura donde se producen las esporas asexuales llamadas conidios) que salen de los estomas, principalmente en la superficie inferior, en el envés de la hoja (Meredith y Laurence, 1969). Las ascosporas o esporas de origen sexual se encuentran dentro de las ascas, las cuales, a su vez, se producen en el interior de los seudotecios o seudoperitecios que aparecen como puntos negros sobre las manchas cenizas, especialmente en hojas que están parcial o totalmente necróticas (Meredith y Laurence, 1969). Las hojas densamente infectadas liberan ascosporas durante dos a cuatro semanas más que cuando se cortan y se colocan en el suelo. Las ascosporas diseminadas por el viento se depositan en las hojas más jóvenes, especialmente en la hoja cigarro y en las cuatro hojas más jóvenes, lo que las convierte en las principales fuentes de inóculo de la enfermedad. (Jaramillo Aguilar et al., 2017)

La enfermedad del banano más grave a nivel mundial es la Sigatoka. Su nombre proviene del Valle de Sigatoka, que fue identificado por primera vez en 1912, en las Islas Fiji. La enfermedad se propagó en todos los países productores de banano durante los próximos cuarenta años. En América Central, la Sigatoka negra surgió en 1934 y en solo dos años arrasó más de 8900 hectáreas de banano en Honduras y Surinam. Para controlar la enfermedad, en 1936 se desarrollaron programas de fumigación con fungicidas utilizando una mezcla de Burdeos (cobre y cal). (Camilo & Correa, 2017)

La Sigatoka Negra se encuentra presente en todos los países de producción bananera y se considera de gran impacto económico porque disminuye los rendimientos,

afectando la productividad de las plantaciones, y por los altos costos para su manejo. (Camilo & Correa, 2017)

2.2.2.1. Factores climáticos en el desarrollo de Sigatoka Negra

La naturaleza heterotática de este microorganismo es el causante de que posea un elevado potencial de cambios genéticos adaptativos dentro las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, siendo esta la razón de su alta variabilidad patogénica detectada.

Su epidemiología depende tanto de factores bióticos y abióticos, además la relación entre temperatura, precipitación, humedad y el patógeno son los factores que condicionan su incidencia y severidad en la aparición de la enfermedad.

El desarrollo de este microorganismo se desarrolla en un rango de 10° a 38° C, siendo lo óptimo 27 °C, en donde se observa que la velocidad de crecimiento en tubos de germinación se acelera, mientras que a 20 °C decrece la velocidad fuertemente. (Camilo & Correa, 2017).

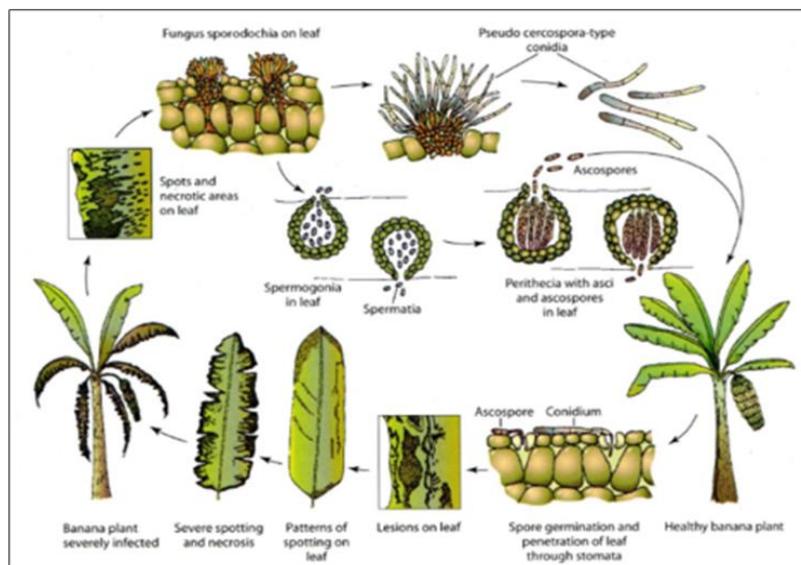


Ilustración 1: Ciclo de vida del hongo *Mycosphaerella fijiensis*

Fuente: (González, 1975)

2.2.3. Generalidades de *Trichoderma* sp.

Trichoderma sp. es un hongo filamentoso, saprófito, anamórfico y aerobio que tiene una pared celular compuesta principalmente por quitina. Se reproduce de forma asexual y tiene una alta densidad poblacional en el suelo. También se adapta fácilmente a diferentes sustratos, tanto sólidos como líquidos. Este hongo puede desarrollarse en una variedad de temperaturas, pH y niveles de humedad, entre otras condiciones. (Hernández-Melchor y colaboradores, 2019)

El *Trichoderma* es un hongo que se caracteriza por su rápido crecimiento sobre varios sustratos, donde su esporulación puede ser beneficiosa dependiendo de varios factores. (Hernández-Melchor y colaboradores, 2019)

2.2.3.1 Taxonomía *Trichoderma* sp.

- Reino: *Fungi*
- Filo: *Ascomycota*
- Clase: *Sordariomycetes*
- Orden: *Hypocreales*
- Familia: *Hypocreaceae*
- Género: *Trichoderma*
- Especies: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, entre otros. (Camilo & Correa, 2017)



Ilustración 2: Morfología de *Trichoderma* vista al microscopio

Fuente: (Beatriz Riveron, 2022)

2.2.3.2. Mecanismos de acción de *Trichoderma* sp.

Las diversas especies de *Trichoderma* controlan a través de la competencia directa (por espacio y nutrientes), la producción de metabolitos antibióticos, la inactivación de enzimas del agente patógeno, la modificación de las condiciones ambientales, la producción de sustancias que fomentan el crecimiento vegetal y el micoparasitismo. Los tres principales son los siguientes (Hilda et al., n.d.):

Competencia: Se cree que uno de los mecanismos clásicos de biocontrol de este tipo es la competencia por espacio y/o nutrientes. Se vuelve un rival fuerte en la colonización de la rizósfera debido a su rápido desarrollo. Además, tiene una mayor capacidad de movilizarse y absorber los nutrientes del suelo, así como una gran versatilidad en el uso de sustratos como fuente de carbono y nitrógeno. Esto le permite colonizar un medio rápidamente y evitar la propagación de otros microorganismos en el mismo hábitat. (Hilda et al., n.d.)

Producción de metabolitos (Antibiosis): El género *Trichoderma* produce compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, que son esenciales para detener el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos. Estas interacciones involucran enzimas líticas extracelulares, antibióticos y compuestos de bajo peso

molecular de esporas, que ayudan a la colonización de varios sustratos y suelo. Guídez et al. (2012)

Micoparasitismo: es una compleja interacción antagonista-patógeno que ocurre en cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento, y actividad lítica. En la última etapa, se producen enzimas líticas extracelulares como quitinasas, glucanasas y proteasas. Estas enzimas descomponen las paredes celulares del patógeno y permiten que las hifas de *Trichoderma* entren. Se ha descubierto que algunas especies de este hongo, particularmente *Trichoderma harzianum*, tienen la capacidad de mejorar el crecimiento y el desarrollo de las plantas. La producción de factores que estimulan el crecimiento de la planta y favorecen la toma de nutrientes, así como la inhibición de patógenos menores, pueden explicar esto (Hernández-Melchor et al., 2019)

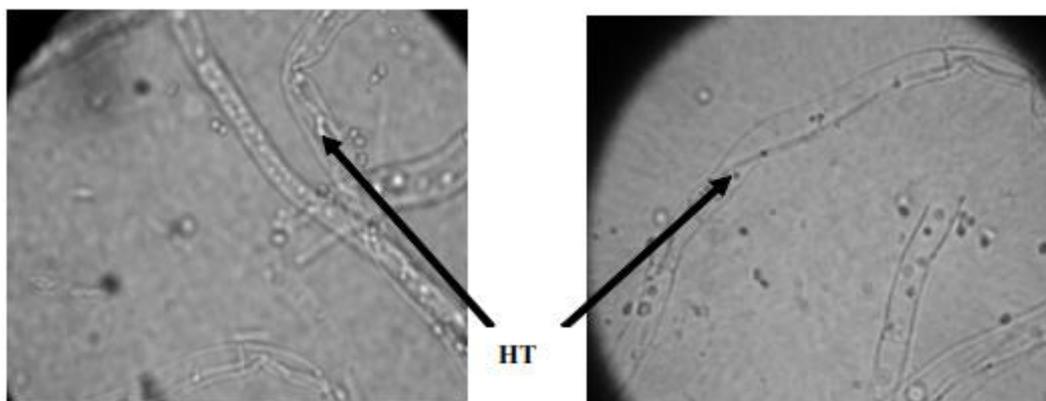


Ilustración 3: Representación de micoparasitismo de *Trichoderma* sp.

Fuente: (Danay, 2009)

2.2.4. Agente de control biológico

El éxito como agente de control biológico se debe a su alta capacidad reproductiva, capacidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, capacidad para modificar la rizósfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos, capacidad para fomentar el crecimiento de las plantas e inducir mecanismos de defensa. El rápido crecimiento micelial y la abundante producción de esporas de las diferentes especies ayudan a la colonización de diversos sustratos y del suelo. (Hernández-Melchor et al., 2019)

Varios mecanismos, como la competencia por nutrientes y espacio, la antibiosis, el hiperparasitismo y la hipovirulencia, pueden provocar una resistencia a patógenos y actuar de forma sinérgica. La eficacia de *Trichoderma* spp. para combatir *Botrytis* spp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani* entre otros patógenos de plantas hace que se utilice como antagonico. (Hernández-Melchor et al., 2019)

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

Los fitopatógenos causan pérdidas en cultivos en términos de calidad biológica (tamaño, color, textura, sabor, calidad nutricional, etc.) y económicas. Según Palacios et al. (2019) Estos fitopatógenos pueden incluir virus, bacterias, nematodos, fitoplasma, viroides y, en su mayoría, hongos, lo que provoca graves pérdidas agrícolas. Estas pérdidas reducen la producción agrícola y aumentan los precios de los alimentos. (Mexicana De Fitopatología et al., 2006)

Trichoderma spp. posee una capacidad micoparasítica a fitopatógenos tanto de raíz, como aéreos. (Poveda, 2021). Es el microorganismo más utilizado como agente de control biológico, debido a que es tolerante a la aplicación de agroquímicos, ayudando a la reducción de la aplicación de plaguicidas y fertilizantes o compuestos de origen químico, que tienen efectos altamente negativos en el medioambiente y en la salud humana. (Mónaco et al., n.d.)

2.2.6. Interacción *Mycosphaerella fijiensis* y *Trichoderma* spp.

2.2.6.1. Efectividad de *Trichoderma* sp. en el control de *Mycosphaerella fijiensis*

- a. En el estudio Efectividad antagonica In Vitro de *Trichoderma* sp., frente a *Stemphylium lycopersici* del año 2022 se concluye que las cepas A-53, A-34 y TS-3 de *Trichoderma* sp. presentan antagonismo *in vitro* frente al patógeno *Stemphylium lycopersici*. (Pozo-Serrano et al., 2019)
- b. En el estudio Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de

cultivo, se concluye la capacidad de la cepa nativa (Ecuador) *T. harzianum* CCECH-p1 para reducir el inóculo de *M. fijiensis* y su potencial como antagonista de este patógeno. (Castro et al., 2015)

- c. El estudio eficiencia de *Trichoderma harzianum* en el control de enfermedades fúngicas del arroz dando como conclusión una eficiencia del 60% y 93.2 % en el control de enfermedades manchas pardas. (Pérez-Torres et al., n.d.)

2.2.7. Filogenia

Estudio de las relaciones evolutivas, que además permite ver las relaciones entre las especies, cuáles son los que descienden con ancestros comunes o también puede indicar la diferencia entre las mismas. (Molina et al., 2016)

2.2.7.1. Filogenia de *Trichoderma*

Hace referencia al estudio de la relación evolutiva entre organismos, siendo la base para entender la variedad genética y funcional dentro del género *Trichoderma* spp., mediante este análisis es posible clasificar e identificar las cepas de *Trichoderma* con precisión, atribuir el potencial de biocontrolador en cepas nuevas con su parentesco a cepas ya conocidas. (Molina et al., 2016)

2.2.7.2. Aplicaciones de la filogenia de *Trichoderma*

La identificación de cepas de manera precisa permite diferenciar entre especies y variantes dentro de un grupo de microorganismo, siendo crucial en el desarrollo de agentes de biocontrol efectivos. Los estudios filogenéticos muestran las relaciones filogenéticas que pueden estar relacionadas con la capacidad de biocontrol. Además, nos permite entender la variedad genética y la relación evolutiva de las especies de *Trichoderma*. (Torres-De La Cruz et al., 2015)

2.2.8. Uso de marcadores de DNA en hongos fitopatógenos

Las características morfológicas, bioquímicas y aloenzimas de los hongos fitopatógenos han sido la base de los estudios de biología y genética. Sin embargo, en años recientes, estos métodos han demostrado ser insuficientes (Df et al., 2016; Zambrano Bullones et al., 2002), y las técnicas de hibridación de DNA y las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se han utilizado para identificar y taxonomizar enfermedades causadas por hongos, determinar los modos reproductivos de hongos asexuales, Sin embargo, los marcadores son una de las herramientas disponibles para llevar a cabo investigaciones genéticas en las poblaciones de patógenos. (García Romero, 2019; Zambrano Bullones et al., 2002).

CAPÍTULO III: Diseño metodológico

3.1. Tipo y diseño de investigación

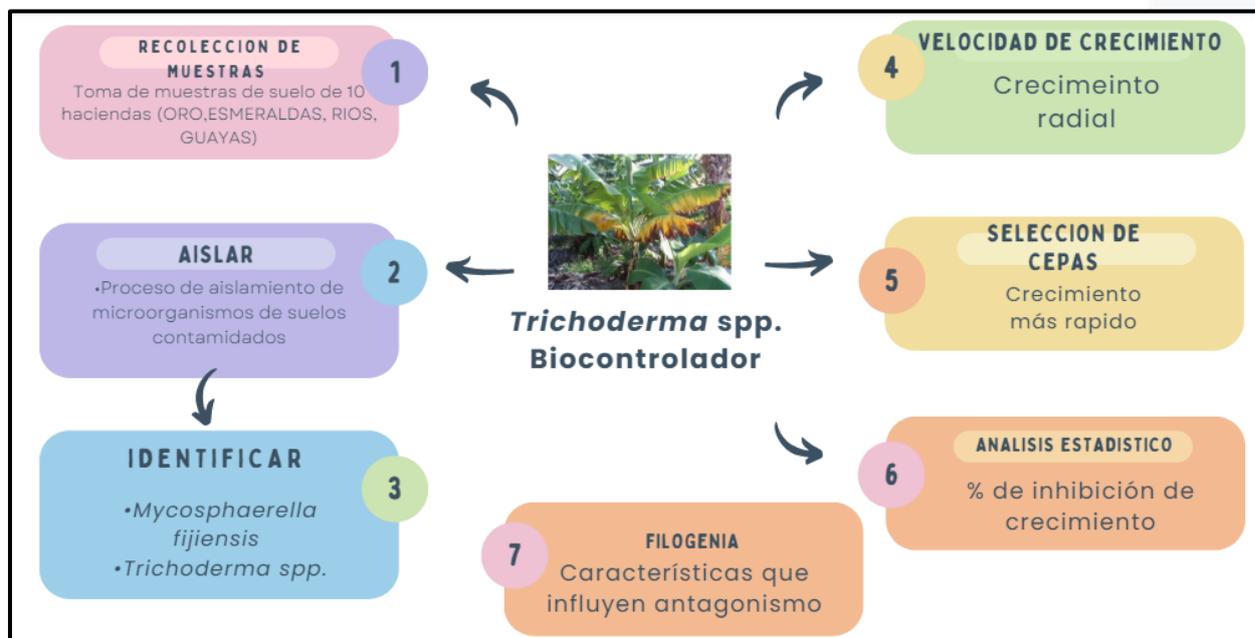
3.1.1. Por el tipo de investigación

Aplicada, debido a que se buscó un objetivo directo e inmediato. Para mejorar el uso de *Trichoderma* spp. y reducir el uso de agroquímicos tóxicos, se propuso determinar el efecto antagónico de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet a nivel de laboratorio.

3.1.2. Por el diseño de investigación

Experimental

3.1.3. Diagrama de diseño metodológico



Elaborado por: Calero, L. & Flores, V. 2024

3.2. La población y la muestra

Diez cepas de *Trichoderma* sp. y una cepa de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) fueron aisladas de muestras de suelo, así como una cepa de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) de muestras vegetales de varios lugares en las provincias de El Oro, Guayas, Los Ríos y Esmeraldas.

3.2.2. Características de la población

Las muestras de suelo y muestras vegetales seleccionadas fueron obtenidas de varias haciendas sin uso de químicos o incorporación de cepas externas de hongos pertenecientes a los hongos analizados de este estudio de cepas nativas, las mismas son dedicadas al cultivo orgánico y convencional, es importante verificar que las muestras obtenidas no contengan impurezas o plagas que puedan llegar a contaminar las muestras, además de establecer una línea base con toda la información de la plantación de banano.

3.3.3. Delimitación de la población

3.3.3.1. Tipo de muestra

Las muestras son probabilísticas ya que cada elemento tiene la misma probabilidad de ser seleccionado, lo que reduce el riesgo de sesgos y garantiza que todos los subgrupos tengan una oportunidad equitativa de estar representados en la muestra.

3.3.3.2. Tamaño de la muestra

- 10 cepas de *Trichoderma*
- Una cepa de *Mycosphaerella fijiensis*

3.3. Proceso de selección de la muestra

Para la recolección de muestras se realizó el recorrido descrito en la tabla 3.

Tabla 3: Códigos y localidades de recolección de muestras de suelo y vegetales de diferentes fincas bananeras para el aislamiento de 10 cepas de *Trichoderma* spp. y una de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

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

Elaborado por: Calero, L. & Flores, V. 2024

3.4. Determinación del ritmo de crecimiento del antagonista

Los esquemas elaborados se utilizaron para registrar los datos relacionados con el ritmo de crecimiento radial de las colonias, cuyos valores se expresaron en milímetros (mm). Los datos se tomaron a intervalos de 0, 24 y 48 horas de 4 radios marcados en cruz de cada colonia.

3.5. Identificación a nivel de especie.

Para determinar a qué especie de *Trichoderma* pertenece cada una de las cepas, se compararon las secuencias de la caracterización molecular con las secuencias de referencia depositadas en la base de datos TrichOkey de ISTH principalmente y en GenBank del NCBI.

3.6. Los métodos y las técnicas

3.3.1. Fase de campo

La recolección de hojas de banano infectadas con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet se llevó a cabo en varios lugares de la provincia de El Oro, Guayas, Los Ríos y Esmeraldas. Las hojas se colocaron en fundas de papel y se etiquetaron adecuadamente. Luego, se enviaron al laboratorio de Fitopatología para su aislamiento según la metodología sugerida por Aimacaña, Castro y Pesántez en 2005.

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

3.3.2. Fase de laboratorio

3.3.2.1 Aislamiento, purificación e identificación del patógeno

Se utilizaron las técnicas de Alvarado et al. (2003) para elegir las partes de la planta afectada. Se cortaron trozos de 7x5 cm en la cámara de aislamiento, se sujetaron con grapas al papel filtro y se depositaron sobre la tapa de un recipiente plástico. Se prepararon portaobjetos con agar-agua al 3%, se dejó solidificar y se colocaron sobre soportes de vidrio dentro de recipientes plásticos con agua. Luego, se cerró la tapa plástica que contenía el tejido mencionado. Para la descarga de esporas, estos recipientes se llevaron a la estufa por 24 horas a 27°C (más o menos 1°C). Después de este tiempo, se examinaron las placas al microscopio para identificar las estructuras distintivas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, que se capturaron con aguja fina y se depositaron en cajas petri con medio de cultivo PDA, las cuales se llevaron a la estufa de crecimiento a 27±1°C hasta la aparición de colonias características.

3.3.2.2 Aislamiento, purificación e identificación del antagonista

Se secó y tamizó una porción de suelo de cada muestra a temperatura ambiente, luego se pesaron 10 g de suelo y se colocaron en un Erlenmeyer con 90 ml de agua destilada estéril; esta suspensión se agitó durante 20 minutos y se dejó reposar por 5 minutos. En una cámara de aislamiento desinfectada, se prepararon cajas Petri "madres" con 1 ml de la suspensión y 12 ml de medio selectivo para *Trichoderma* spp., distribuyendo la suspensión uniformemente con movimientos circulares. Una vez solidificado el medio, se obtuvieron aproximadamente 90-100 círculos por caja Petri "madre" utilizando un sacabocados de 4 mm de diámetro; alrededor de 30 círculos fueron transferidos a 3 cajas Petri "hijas" con el mismo medio selectivo y se incubaron a 27±1°C en oscuridad por cinco días, y luego a la luz por dos días. Al séptimo día se verificaron las colonias de *Trichoderma* spp. presentes en los círculos y se identificaron mediante microscopio y claves correspondientes. Una vez identificado el antagonista, se reactivó en cajas Petri con medio PDA para realizar pruebas de ritmo de crecimiento y antagonismo según la metodología de Castro y Pesántez (2005).

3.3.3. Determinación del ritmo de crecimiento del antagonista

De las diez cepas de *Trichoderma* spp, se retiraron discos de 4 mm de diámetro de micelio joven con un sacabocados para inocularlos en el centro de cajas con aproximadamente 15 ml de PDA, registrándose el ritmo de crecimiento radial de las colonias en esquemas elaborados con valores expresados en mm; los datos se tomaron a intervalos de 24 horas durante 120 horas en 4 radios marcados en cruz de cada colonia, con cada prueba constituida por tres repeticiones.

3.3.4. Identificación molecular de *Trichoderma* spp.

Para la secuenciación de ADN de las muestras fúngicas utilizando los marcadores ITS1/ITS4, se prepararon cajas Petri con cultivo puro de cada una de las diez cepas seleccionadas para el ensayo.

3.3.5. Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo descrito por Plaza et al. (2004), con modificaciones, para extraer ADN de las muestras fúngicas. Para aislar el ADN, se recolectaron de 200 a 400 mg de micelio de hongo fresco en microtubos de 2 mL. Luego, la muestra se resuspendió en 500 μ L de buffer de extracción (0,1 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0, 5% de SDS), se maceró con arena de cuarzo por 10 minutos, se centrifugó a 13.000 rpm y se recuperó sobrenadante. Se agregó 500 μ L de buffer de extracción de nuevo al pellet formado y se repitió el proceso de maceración y centrifugación. Se agregó el mismo volumen de fenol al sobrenadante recuperado: El alcohol isoamílico de cloroformo es de 25:24:1. Se agitó con fuerza en vórtex; se centrifugó por cinco minutos a 13.000 rpm y se extraía la fase acuosa con cuidado. Se agregó el mismo volumen de cloroformo como el alcohol isoamílico (24:1), se mezcló bien y se centrifugó por 5 minutos a 13.000 rpm. Se colocó la fase acuosa en un nuevo tubo, se añadieron 600 μ L de isopropanol (-20°C) para precipitar el ADN, se mezcló por inmersión y se almacenó en hielo por una hora. Posteriormente, se centrifugó por 10 minutos a máxima velocidad. El pellet de ADN se lavó dos veces con etanol al 70% y se secó

por 20 minutos a 37°C. Finalmente, se resuspendido en 50 µL de buffer TE (0.1M, pH8).

3.3.6. Cuantificación ADN

Se utilizó el espectrofotómetro Epoch®, con el software Gen5 2, para medir la concentración de ADN.

3.3.7. Secuenciación

En el proceso de secuenciación, se requirieron réplicas de la amplificación para cada muestra, se llevaron a cabo cuatro repeticiones para asegurar una concentración adecuada de amplificación, ya que se había purificado. El kit de purificación de producto PCR PureLink® PCR Purification Kit - Life Technologies (no. catK3100-01) se utilizó para este procedimiento de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

El kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing se utilizó para realizar la reacción de secuencia con un volumen de 10 uL de reacción, siguiendo las especificaciones del fabricante, y se utilizó el método de precipitación con EDTA/Etanol para purificar el producto PCR purificado.

Las muestras se secuenciaron en ABI PRISM 310 y se analizaron con el software de secuenciación.

3.3.8. Pruebas de Antagonismo

Con la ayuda de sacabocados, las diez cepas seleccionadas de *Trichoderma* sp. y una cepa del patógeno *Mycosphaerella fijiensis* se sembraron en cajas petri con alrededor de 15 mililitros de medio PDA. Se extrajo un disco de micelio joven de la periferia de la caja y se inoculó el antagonista y el patógeno en los extremos de las cajas petri con el mismo medio de cultivo.

Se registraron datos del crecimiento radial de cada una de las diez cepas de *Trichoderma* sp. y del patógeno *Mycosphaerella fijiensis*. Cada 24 horas se tomaron mediciones en mm y se incubó durante 120 horas a 27 + 1°C.

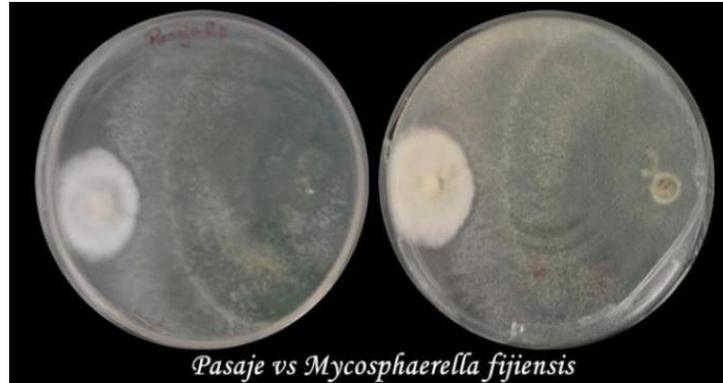


Ilustración 4: Antagonismo hiperparasitario

Elaborado por: Calero L. & Flores V. 2024

Se determinó la fuerza antagónica en estos grupos en función del aumento que experimentó el patógeno como resultado de la acción contraria del antagonista en comparación con su nivel normal.

Para evaluar, se utilizaron las siguientes escalas:

- ++ Elevada intensidad de antagonismo (el patógeno es inhibido en más del 25% durante el desarrollo).
- + Intensidad de antagonismo intermedio (el patógeno es inhibido en menos del 25% durante el desarrollo).
- Intensidad nula de antagonismo (el patógeno no es inhibido durante el desarrollo).

3.3.9. Árbol filogenético de *Trichoderma* spp.

El árbol filogenético se obtuvo mediante el programa MEGA, comparando 10 cepas de *Trichoderma* sp. con secuencias similares descargadas del Centro Nacional de Información Biotecnológica; para cada cepa se descargaron 3 secuencias similares, sumando un total de 30 secuencias. El proceso fue el siguiente: se elaboró un documento en formato texto que se convirtió a formato FASTA para su lectura en MEGA, se alinearon las secuencias y se realizó un corte debido a una desigualdad en las colas, transformándolas posteriormente en proteínas. El documento se exportó nuevamente en formato FASTA, se seleccionó la opción de filogenia en MEGA para el archivo alineado de proteínas y se construyó el árbol filogenético utilizando maximum likelihood con 1000 réplicas de bootstrap, obteniendo un árbol con las 10 cepas de *Trichoderma* y las 30 secuencias similares.

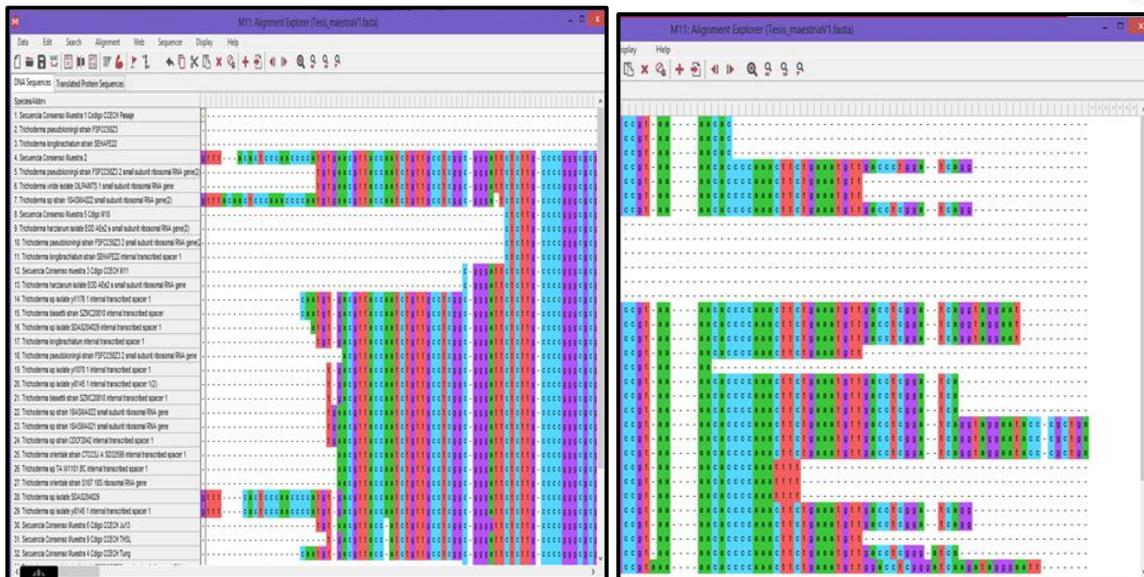


Ilustración 5: Secuencias formato Fasta

Elaborado por: Calero L. & Flores V. 2024

3.4. Procesamiento estadístico de la información.

3.4.1 Fuente de datos

Los datos manipulados del presente estudio provienen del experimento en el que se midió en mm los halos de crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* vs *Trichoderma*. Estas mediciones tienen tres repeticiones para poder tener una fiabilidad en los resultados, las condiciones usadas en el laboratorio fueron controladas evitando la variación externa.

3.4.2 Programa estadístico utilizado

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa R studio, debido a su amplia gama de análisis estadístico, en donde se pudo realizar comparaciones de datos de los halos de crecimiento mediante el uso de las medias de la toma de datos desde las 0 hasta las 48 horas y la obtención de los porcentajes de inhibición.

3.4.3. Técnica usada en el análisis

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software R, versión 4.3.3. primero se realizó test para verificar si los datos son normales y presentan homocedasticidad, en el caso que no cumplan los 2 supuestos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, además se realizó grafico de boxplot para corroborar las diferencias significativas entre los tratamientos.

3.4.4. Filogenia

El árbol filogenético obtenido se elaboró con el programa Mega mediante la opción Likelihood un algoritmo de alta verosimilitud y con un bootstrap de 1000 réplicas, para este análisis se evaluó las 10 cepas de *Trichoderma* aisladas en el laboratorio juntamente con cepas similares descargadas de la página Centro nacional de Información biotecnológica (NCBI).

3.4.5. Alcance y limitación del análisis

Como alcance de la investigación se identificaron las diferencias significativas entre el enfrentamiento de crecimiento de los halos de *Micosphaerella fijiensis* y *Trichoderma* spp. bajo condiciones de laboratorio anteriormente descritas. A pesar de esto, una de las limitaciones en el desarrollo de la investigación fueron el tamaño de la muestra para obtener un mayor número de repeticiones, otra limitante fue realizar bajo condiciones totalmente controladas que van a diferir con lo que pueda suceder en el medio natural en donde los microorganismos interactúan.

3.4.6. Interpretación de resultados

En esta investigación, al ser de enfoque experimental involucrando observaciones y medición de variables dependientes, permite la obtención de datos de interés para las distintas formulaciones aplicadas; con el fin de validar los resultados se realizaron 3 repeticiones y controles continuos. Se utilizaron métodos estadísticos para asegurar una buena interpretación de los datos obtenidos mediante el software R, versión 4.3.3. con un análisis de varianza ANOVA que permite determinar si al menos un grupo difiere significativamente de los demás en términos de sus medias en los tratamientos aplicados.

CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados

4.1. Aislamiento y purificación de 1 cepa de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

Se aisló e identificó el hongo de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de las muestras de suelo recolectadas del cultivo de banano.

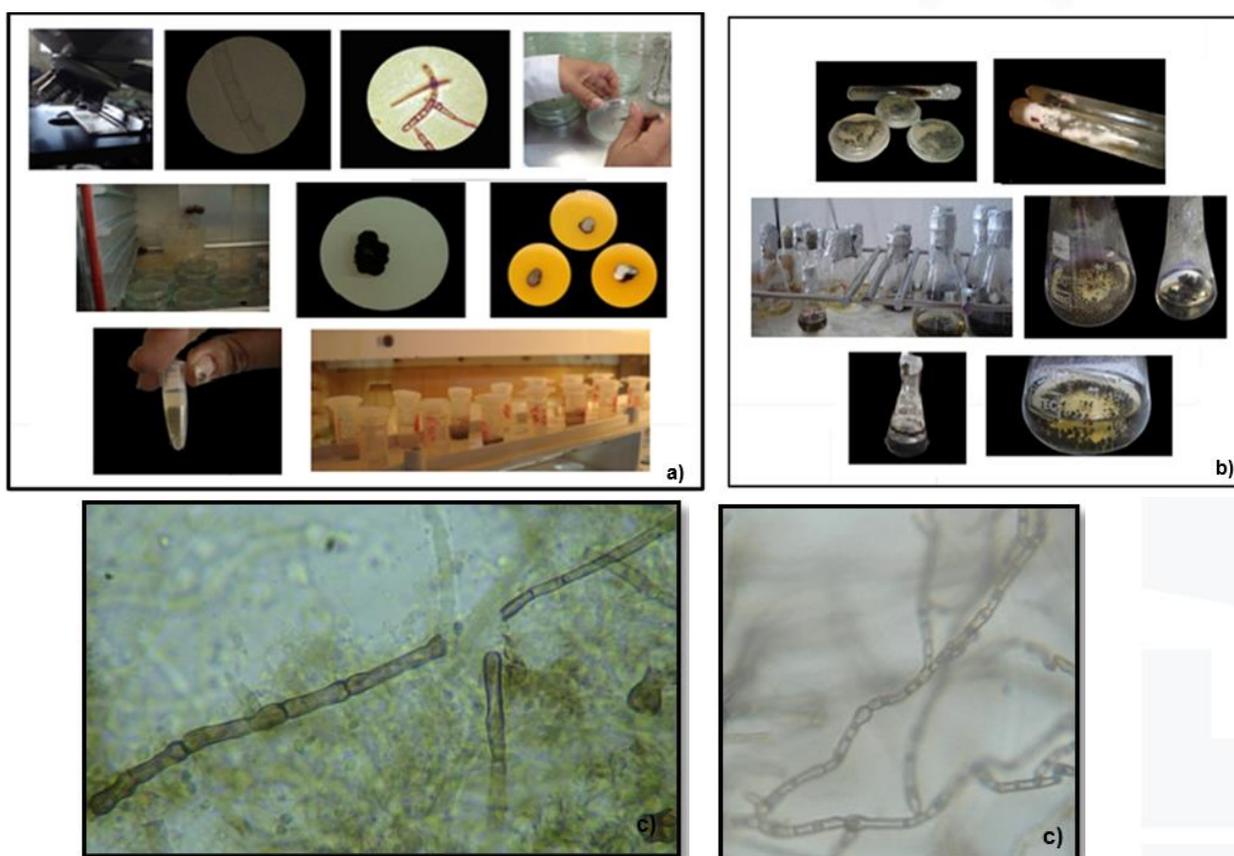


Ilustración 6: Aislamiento e identificación de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. a) Cultivos monospóricos y cultivos puros. b) Preparación de inóculos de *Mycosphaerella fijiensis* c) *Mycosphaerella fijiensis* vista al microscopio

Elaborado por: Calero L.&, Flores V. 2024

4.2. Aislamiento y purificación de las cepas de *Trichoderma* spp.

En el proceso de identificación de las cepas de *Trichoderma* spp. se estableció que de las 10 cepas nativas son: 3 cepas nativas provenientes de el Oro y Guayas

pertencen a la especie *Trichoderma harzianum*, 3 cepas del Oro y Esmeraldas son de la cepa *Trichoderma pseudokoningii*, 2 cepas de la provincia del Oro *Trichoderma viride* y 1 cepa de El Oro es *Trichoderma longibrachiatum*.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en un estudio de la universidad Espe de Santo Domingo quienes también buscaron identificar qué especies predominan en los cultivos de banano teniendo como resultado las cepas *harzianum*, *viride* y *longibrachiatum*.

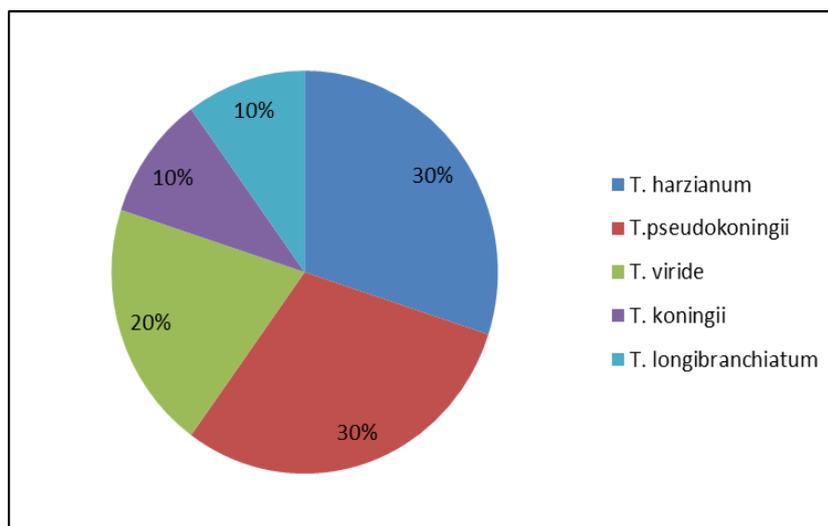


Ilustración 7: Distribución por Especies de las Cepas de la Colección de Cultivos microbianos de la ESPOCH.

Elaborado por: Calero, L.& Flores, V. 2024

4.3. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software R, versión 4.3.3.

4.3.1. Ritmo de Crecimiento radial de *Trichoderma* spp. por tratamientos

Se realizó una prueba para verificar si los datos de crecimiento radial son normales y siguen una homocedasticidad, porque el p-valor es mayor a 0.05.

Dado que los datos de la variable RCA_RCP (Radio de Crecimiento Antagonista vs Radio de Crecimiento Patógeno) no siguen una distribución normal y son no paramétricos, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis.

Verificamos que el p valor es menor a 0.05, es decir si hay diferencia significativa entre los tratamientos.

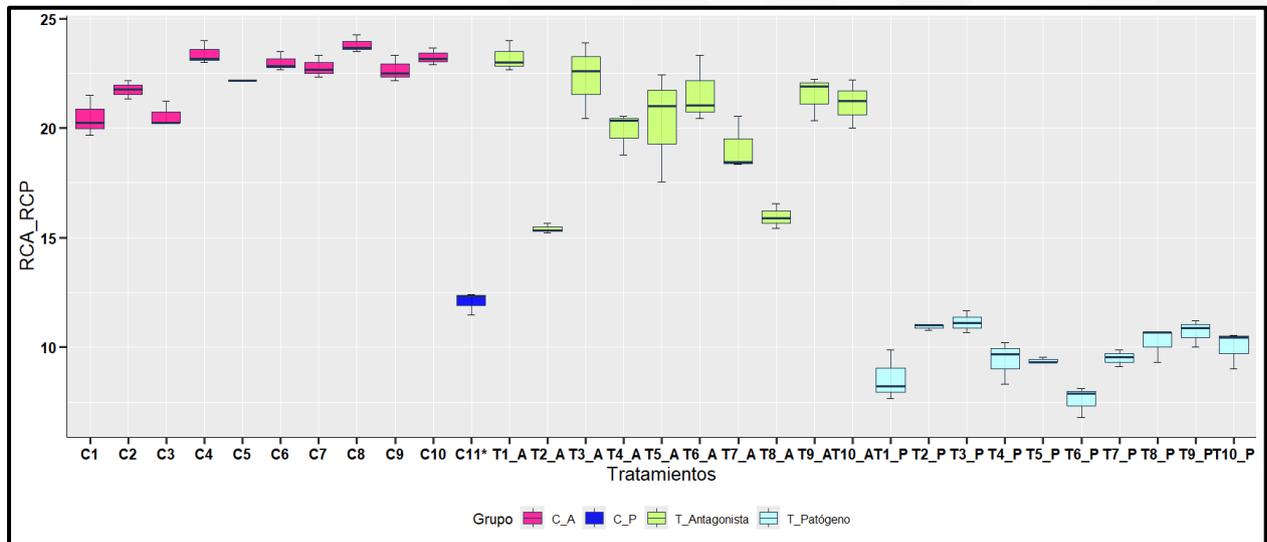


Ilustración 8: Crecimiento radial *Trichoderma* spp. vs *Mycosphaarella fijiensis*

Elaborado por: Calero, L.& Flores, V. 2024

En el gráfico podemos corroborar la diferencia de crecimiento radial entre los tratamientos, es así como C1 valor de control de *Trichoderma* spp. Se observa que crece aproximadamente 21 mm, mientras que la primera prueba antagónica (T1_A) indica que creció más que el primer control ya que creció 24 mm y la (T1_P) crece aproximadamente 6mm. Por lo tanto, podemos decir que existen diferencias significativas entre los tratamientos con relación a la variable crecimiento radial, además podemos mencionar que las variaciones de crecimiento radial entre las cepas pueden atribuirse a variaciones genéticas y fisiológicas entre estas, por ende, este es un factor que va a influir sobre la eficacia como agente de biocontrol.

4.3.2. Porcentaje de inhibición de crecimiento de *Mycosphaarella fijiensis*

Para este apartado se utilizó la fórmula:

$$PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$$

Donde:

R1 = es el radio mayor (radio patógeno testigo)

R2 = es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con el antagonista)

Para el realizar el análisis estadístico primero se verifico que los datos sean normales, para lo cual se obtuvo un valor de $p=0.1803$, por lo tanto, se aplicó ANOVA.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TRATAMIENTOS	9	3037.2	337.5	7.247	0.00012 ***
Residuals	20	931.4	46.6		

signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Teniendo un valor de 0.00012, que nos indica que hay diferencias significativas con respecto a la variable porcentaje de inhibición, y para corroborar estos resultados se realizó un diagrama de box plot.

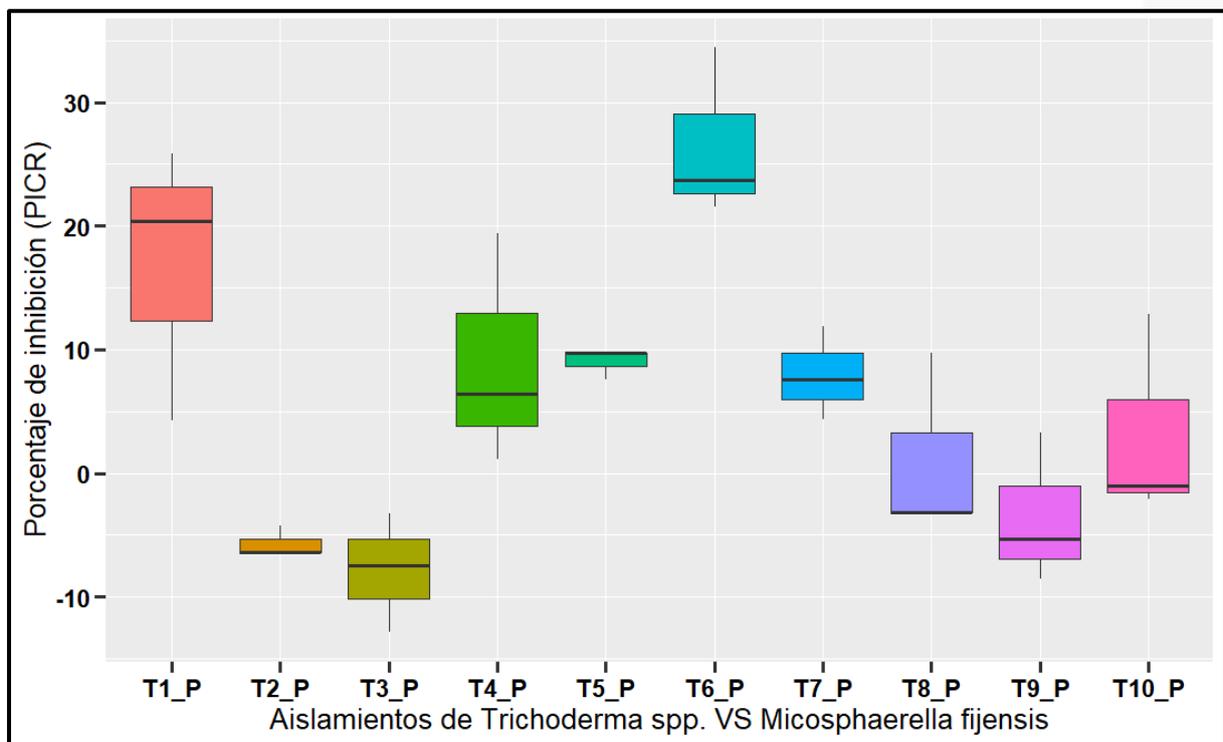


Ilustración 9: Boxplot del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR%) de *Micosphaerella fijjensis*

Elaborado por: Calero, L.& Flores, V. 2024

En la ilustración podemos verificar que T1_P Y T6_P, son las que presentan un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *Mycosphaerella fijjensis*, correspondiendo

a las cepas *Trichoderma harzianum* A (CCECH_Ca 36-3) y *Trichoderma pseudokoningii* A (CCECH-M11)

```
> kruskal_PICR <- kruskal.test( PICR % ~ TRATAMIENTOS, data = data_PICR)
> print(kruskal_PICR)

      Kruskal-wallis rank sum test

data:  PICR % by TRATAMIENTOS
Kruskal-wallis chi-squared = 22.118, df = 9, p-value = 0.008512
```

Una vez que se aplicó ANOVA debemos verificar si cumplen los dos supuestos de homocedasticidad y normalidad, en donde se verifica que el valor de p-valor de homocedasticidad es menor a 0.05, por lo cual aplicamos un test de Kruskal-Wallis que determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos dando un p-valor significativo de 0.008512, menor al establecido.

La significancia reportada por el Kruskal Test, fue contrastada por un Dunn Test, representada en la Tabla 4, donde se indica que existen diferencias significativas entre el tratamiento T3_P vs T6_P, ya que presentó un valor de significancia menor (p-valor= 0.034)

Tabla 4: Valor de significancia de *Trichoderma* spp.

Comparison	P.adj	Significance
T1_P - T10_P	1.0000000	Non-Significant
T1_P - T2_P	0.55099059	Non-Significant
T10_P - T2_P	1.0000000	Non-Significant
T1_P - T3_P	0.34399420	Non-Significant
T10_P - T3_P	1.0000000	Non-Significant
T2_P - T3_P	1.0000000	Non-Significant
T1_P - T4_P	1.0000000	Non-Significant
T10_P - T4_P	1.0000000	Non-Significant
T2_P - T4_P	1.0000000	Non-Significant
T3_P - T4_P	1.0000000	Non-Significant
T1_P - T5_P	1.0000000	Non-Significant
T10_P - T5_P	1.0000000	Non-Significant
T2_P - T5_P	1.0000000	Non-Significant
T3_P - T5_P	1.0000000	Non-Significant
T4_P - T5_P	1.0000000	Non-Significant

T1_P - T6_P	1.0000000	Non-Significant
T10_P - T6_P	1.0000000	Non-Significant
T2_P - T6_P	0.06165671	Non-Significant
T3_P - T6_P	0.03466633	Significant (<i>Trichoderma harzianum C</i> , <i>Trichoderma pseudokoningii A</i>)
T4_P - T6_P	1.0000000	Non-Significant
T5_P - T6_P	1.0000000	Non-Significant
T1_P - T7_P	1.0000000	Non-Significant
T10_P - T7_P	1.0000000	Non-Significant
T2_P - T7_P	1.0000000	Non-Significant
T3_P - T7_P	1.0000000	Non-Significant
T4_P - T7_P	1.0000000	Non-Significant
T5_P - T7_P	1.0000000	Non-Significant
T6_P - T7_P	1.0000000	Non-Significant
T1_P - T8_P	1.0000000	Non-Significant
T10_P - T8_P	1.0000000	Non-Significant
T2_P - T8_P	1.0000000	Non-Significant
T3_P - T8_P	1.0000000	Non-Significant
T4_P - T8_P	1.0000000	Non-Significant
T5_P - T8_P	1.0000000	Non-Significant
T6_P - T8_P	1.0000000	Non-Significant
T7_P - T8_P	1.0000000	Non-Significant
T1_P - T9_P	1.0000000	Non-Significant
T10_P - T9_P	1.0000000	Non-Significant
T2_P - T9_P	1.0000000	Non-Significant
T3_P - T9_P	1.0000000	Non-Significant
T4_P - T9_P	1.0000000	Non-Significant
T5_P - T9_P	1.0000000	Non-Significant
T6_P - T9_P	0.15623984	Non-Significant
T7_P - T9_P	1.0000000	Non-Significant
T8_P - T9_P	1.0000000	Non-Significant

Elaborado por: Calero, L.& Flores, V. 2024

En la tabla 4 se determinó también que hay significancia en las cepas 3 y 6 que corresponden a *Trichoderma harzianum C*, *Trichoderma pseudokoningii A*, lo mismo que se vuelve a corroborar en el gráfico de Dunn.

Tabla 5: Valor de significancia de *Trichoderma* spp.

Comparison	P.adj	Significance
T1_P - T10_P	1.00000 000	Non-Significant
T1_P - T2_P	0.55099 059	Non-Significant
T10_P - T2_P	1.00000 000	Non-Significant
T1_P - T3_P	0.34399 420	Non-Significant
T10_P - T3_P	1.00000 000	Non-Significant
T2_P - T3_P	1.00000 000	Non-Significant
T1_P - T4_P	1.00000 000	Non-Significant
T10_P - T4_P	1.00000 000	Non-Significant
T2_P - T4_P	1.00000 000	Non-Significant
T3_P - T4_P	1.00000 000	Non-Significant
T1_P - T5_P	1.00000 000	Non-Significant
T10_P - T5_P	1.00000 000	Non-Significant
T2_P - T5_P	1.00000 000	Non-Significant
T3_P - T5_P	1.00000 000	Non-Significant
T4_P - T5_P	1.00000 000	Non-Significant
T1_P - T6_P	1.00000 000	Non-Significant
T10_P - T6_P	1.00000 000	Non-Significant
T2_P - T6_P	0.06165 671	Non-Significant
T3_P - T6_P	0.03466 633	Significant (Trichoderma harzianum C, Trichoderma pseudokoningii A)
T4_P - T6_P	1.00000 000	Non-Significant
T5_P - T6_P	1.00000 000	Non-Significant
T1_P - T7_P	1.00000 000	Non-Significant
T10_P - T7_P	1.00000 000	Non-Significant
T2_P - T7_P	1.00000 000	Non-Significant
T3_P - T7_P	1.00000 000	Non-Significant
T4_P - T7_P	1.00000 000	Non-Significant
T5_P - T7_P	1.00000 000	Non-Significant
T6_P - T7_P	1.00000 000	Non-Significant
T1_P - T8_P	1.00000 000	Non-Significant
T10_P - T8_P	1.00000 000	Non-Significant
T2_P - T8_P	1.00000 000	Non-Significant
T3_P - T8_P	1.00000 000	Non-Significant
T4_P - T8_P	1.00000 000	Non-Significant
T5_P - T8_P	1.00000 000	Non-Significant

T6_P - T8_P	1.00000 000	Non-Significant
T7_P - T8_P	1.00000 000	Non-Significant
T1_P - T9_P	1.00000 000	Non-Significant
T10_P - T9_P	1.00000 000	Non-Significant
T2_P - T9_P	1.00000 000	Non-Significant
T3_P - T9_P	1.00000 000	Non-Significant
T4_P - T9_P	1.00000 000	Non-Significant
T5_P - T9_P	1.00000 000	Non-Significant
T6_P - T9_P	0.15623 984	Non-Significant
T7_P - T9_P	1.00000 000	Non-Significant
T8_P - T9_P	1.00000 000	Non-Significant

Elaborado por: Calero, L.& Flores, V. 2024

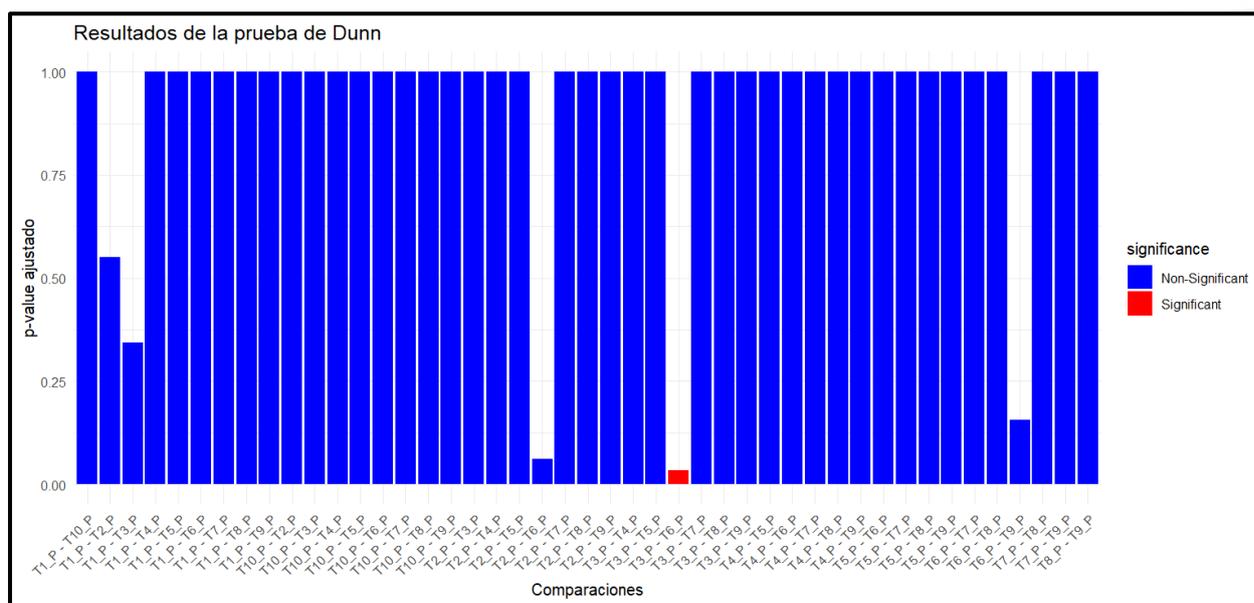


Ilustración 10: Valores de significancia de *Trichoderma* spp. con la prueba Dunn para el porcentaje de inhibición de crecimiento de *Mycosphereella fijiensis*

Elaborado por: Calero, L.& Flores, V. 2024

4.3.3. Índice de crecimiento radial del *Trichoderma* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis*

Para esta variable se realizó un boxplot para determinar las diferencias entre los tratamientos del índice de crecimiento radial.

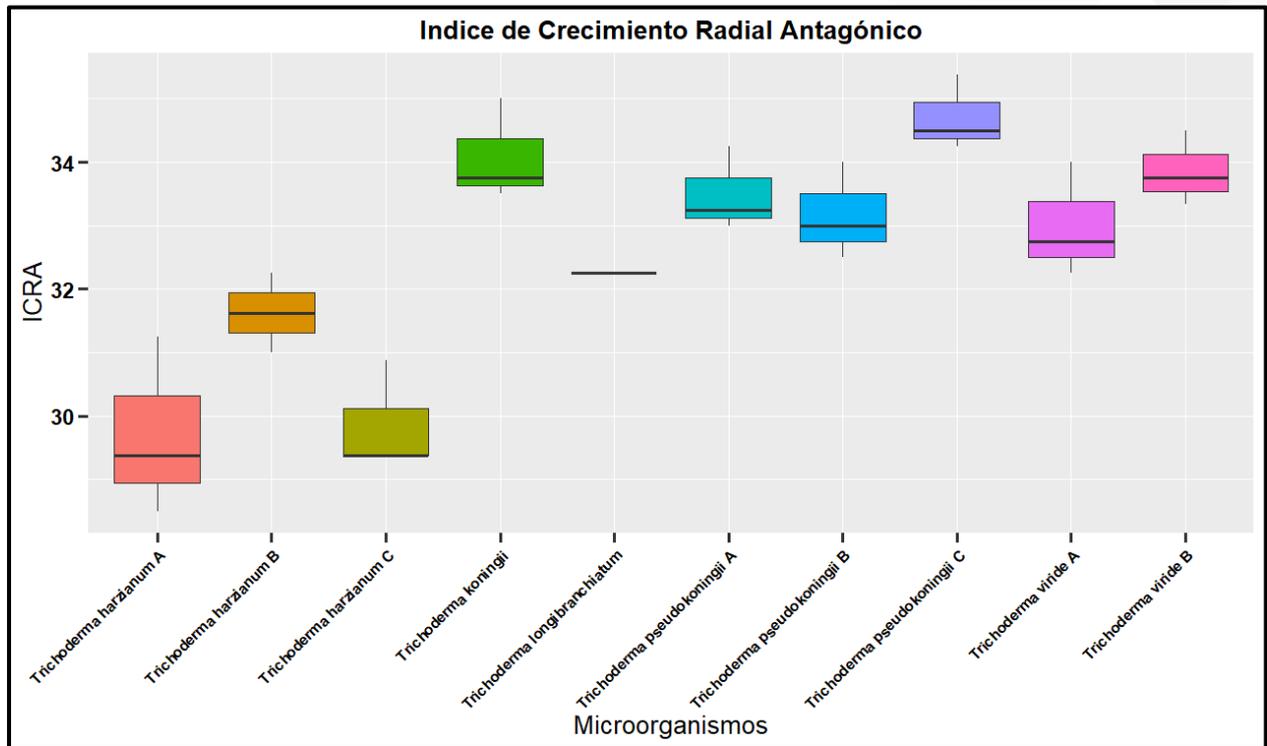


Ilustración 11: Índice de crecimiento radial antagónico

Elaborado por: Calero, L.& Flores, V. 2024

gráfico nos indica los valores de crecimiento radial del hongo *Trichoderma*. El estadístico de Kruskal Test determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos dando un p-valor significativo de 0.002933, menor al establecido.

```
> kruskal_PICR <- kruskal.test(ICRA~ MICROORGANISMO, data = data)
> print(kruskal_PICR)
```

```
Kruskal-wallis rank sum test
```

```
data: ICRA by MICROORGANISMO
Kruskal-wallis chi-squared = 25.035, df = 9, p-value = 0.002933
```

```
> kruskal_PICR <- kruskal.test(ICRA~ MICROORGANISMO, data = data)
> print(kruskal_PICR)
```

kruskal-wallis rank sum test

data: ICRA by MICROORGANISMO

Kruskal-wallis chi-squared = 25.035, df = 9, p-value = 0.002933

También se puede observar en el gráfico de Dunn la diferencia significativa:

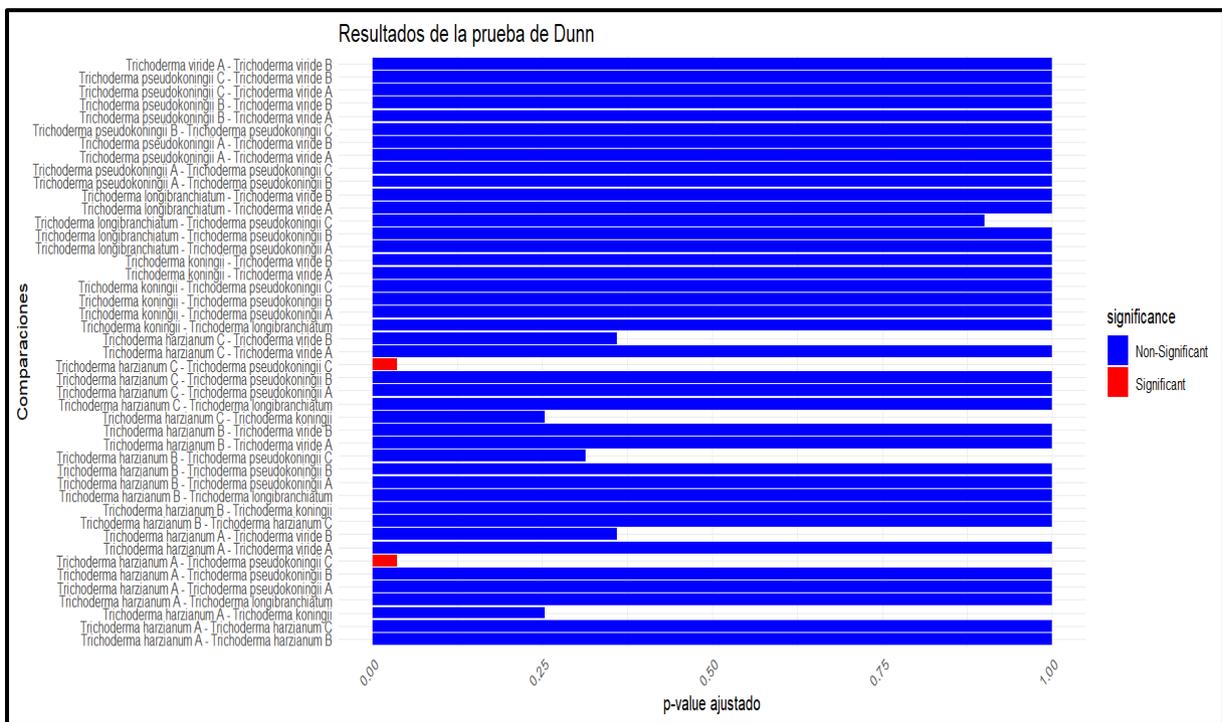


Ilustración 12: Índice de crecimiento radial -Prueba de Dunn

Elaborado por: Calero, L.& Flores, V. 2024

4.4. Identificación Molecular de *Trichoderma* spp.

Se estudiaron diez cepas biocontroladoras nativas de *Trichoderma* spp, cada una con sus propios requerimientos nutricionales y una alta similitud genética.

La extracción del ADN del material fúngico fue exitosa, todos los aislamientos presentaron la precipitación del ácido como se muestra en la ilustración 13.

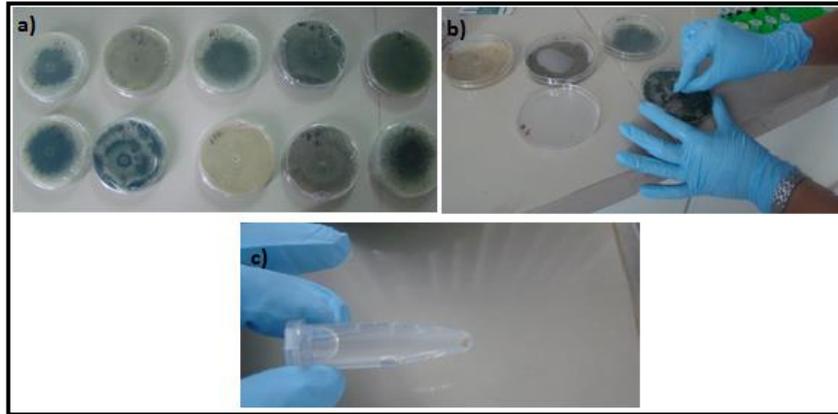


Ilustración 13: a) Cultivos de hongos frescos para extracción de ADN. b) Obtención de micelio fresco mediante raspa para extracción de ADN. c) Finalización de la extracción de ADN, precipitación del ácido (pellet) con isopropanol.

Elaborado por: Calero, L. & Flores, V. 2024

4.4.1. Cuantificación de ADN:

El detalle de la cuantificación pureza del ADN de los aislados fúngicos se detalla en la tabla 5.

Tabla 5: Cuantificación y pureza de ADNs extraídos

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

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

Elaborado por: Calero, L. & Flores, V. 2024

4.5. Identificación molecular de *Trichoderma* spp. por secuenciación.

Tabla 6: Identificación molecular de *Trichoderma* spp. por secuenciación.

Muestra	SECUENCIA ITS 1 (PB)	VALOR Q (%)	SECUENCIA ITS 4 (PB)	VALOR Q (%)	SECUENCIA CONSENSO (PB)	BLAST	% IDENTIDAD
1	537	89,9	500	80,2	445	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100
						<i>Trichoderma viride</i>	100
						<i>Hypocrea sp.</i>	100
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	100
						<i>Hypocrea jecorina</i>	99
						<i>Hypocrea koningii</i>	100
						<i>Trichoderma harzianum</i>	
						<i>Trichoderma sp</i>	
2	580	90	575	84,5	556	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
						<i>Trichoderma viride</i>	99
						<i>Uncultures Hypocrea clone</i>	99
						<i>Hypocrea sp.</i>	99
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	99
							99
							99

						<i>Hypocrea orientalis</i>	
						<i>Hypocrea rufa strain</i>	
						<i>Trichoderma cf. longibrachiatum</i>	
						<i>Hypocrea cerebriformis</i>	
3	504	90,6	529	85,4	436	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100
						<i>Trichoderma viride</i>	100
						<i>Uncultured Hypocreaceae clone</i>	100
						<i>Hypocrea sp.</i>	100
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	100
						<i>Trichoderma sp.</i>	100
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	
						<i>Hypocrea orientalis</i>	
						<i>Trichoderma harzianum</i>	

4	634	82,4	548	51,5	555	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
						<i>Trichoderma viride strain</i>	98
						<i>Uncultured Hypocreaceae clone Bo-Arch-F1</i>	98
						<i>Hypocrea sp.SHWO6</i>	98
						<i>Hypocrea koningii strain</i>	98
						<i>Trichoderma sp.</i>	98
						<i>Hypocrea pseudokoningii strain S</i>	98
						<i>Hypocrea sp.</i>	98
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	98
						<i>Hypocrea orientalis</i>	98
						<i>Trichoderma cf. longibrachiatum</i>	98

5	500	83,8	523	89,3	421	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100
						<i>Trichoderma viride</i>	100
						<i>Uncultured Hypocreaceae</i>	100
						<i>Hypocrea sp.</i>	100
						<i>Hypocrea koningii</i>	100
						<i>Trichoderma sp.</i>	100
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	
						<i>Hypocrea orientalis</i>	
						<i>Trichoderma harzianum</i>	
6	617	82	554	81,2	524	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
						<i>Trichoderma viride strain</i>	99
						<i>Uncultures Hypocreaceae</i>	99
						<i>Hypocrea sp.</i>	99
						<i>Hypocrea koningii</i>	99
						<i>Trichoderma sp.</i>	99
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	

						<i>Hypocrea orientalis</i>	
						<i>Hypocrea rufa</i>	
						<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
						<i>Trichoderma viride</i>	99
						<i>Trichoderma sp.</i>	99
						<i>Hypocrea sp.</i>	99
						<i>Hypocrea koningii</i>	99
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	99
						<i>Hypocrea orientalis</i>	99
						<i>Hypocrea lixii</i>	
7	713	74,1	556	80	558	<i>Hypocrea rufa</i>	

8	583	87,8	547	82,3	532	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	97
						<i>Hypocrea orientalis</i>	96
						<i>Trichoderma harzianum</i>	97
						<i>Hypocrea rufa</i>	97
						<i>Trichoderma viride</i>	97
						<i>Trichoderma sp.</i>	97
						<i>Hypocrea sp.</i>	97
						<i>Hypocrea lixii</i>	96
						<i>Hypocrea cerebriformis</i>	97
						<i>Uncultured fungus clone LXH05</i>	
						<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	

9	626	82,7	552	83,7	535	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
						<i>Trichoderma viride</i>	99
						<i>Uncultures Hypocreaceae clone Bo-Arch-F1</i>	99
						<i>Hypocrea sp. SHW06</i>	99
						<i>Hypocrea koningii</i>	99
						<i>Trichoderma sp.</i>	99
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	
						<i>Hypocrea orientalis</i>	
						<i>Hypocrea rufa</i>	

10	555	89	548	65,9	504	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	99
						<i>Trichoderma viride</i>	99
						<i>Uncultures Hypocreaceae</i>	99
						<i>Hypocrea sp. SHW06</i>	99
						<i>Hypocrea koningii</i>	99
						<i>Trichoderma sp.</i>	99
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	99
						<i>Hypocrea jecorina</i>	
						<i>Hypocrea orientalis</i>	
						<i>Trichoderma harzianum</i>	

Fuente: (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias INIAP, 2024)

Elaborado por: Calero, L. & Flores, V. 2024

En general, al utilizar marcadores moleculares, se encontró una relación entre el agrupamiento de los aislamientos con la procedencia de cada uno de ellos, y se demostró la variabilidad existente entre los mismos, lo que indica que es una técnica confiable para la caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp. Estos hallazgos corroboran los de Latha y Mukherjee (2002), quienes mencionaron que los marcadores RAPD mostraron una gran variabilidad intra e interespecífica entre las cepas de *Trichoderma* examinadas. De igual manera, Góes et al. (2002) señalaron que el uso de RAPD permitió la variabilidad entre los aislamientos de *Trichoderma*.

La ubicación taxonómica de las cepas en estudio es crucial porque proporciona un punto de partida que permitirá un mejor diseño de experimentos, evaluar su actividad biológica en diferentes condiciones de crecimiento, determinar sus mecanismos de

acción y establecer interacciones con la planta. La identificación de organismos potenciales como antagonistas patógenos e inductores de resistencia en las plantas será más fácil con la ayuda de esta información combinada.

El análisis molecular de *Trichoderma* spp. demostró que los rasgos genéticos pueden usarse para organizar los aislados en grupos o relacionarlos por áreas geográficas similares. Sin embargo, si la intención es seleccionar a *Trichoderma* spp. como inductores de resistencia o como agentes de control biológico, se deben realizar pruebas bioquímicas y fisiológicas para determinar si esta diversidad está relacionada con mecanismos de acción y luego compararla con los respectivos.

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

Trichoderma ha sido objeto de numerosas investigaciones, desde aislamientos y multiplicación en los años 80 (Zambrano 1981) hasta caracterizaciones moleculares realizadas por Pavone (2012), quien identifica las especies de *Trichoderma* utilizando las mismas secuencias de los espaciadores transcritos internos del DNA ribosomal (ITS 1 y 2) y el factor de elongación de la traducción 1a (*tef1*) con los programas TrichoKEY, TrichoMARK y TrichoBLAST (www.isth.info) que se utilizaron en esta investigación y los resultados fueron certeros; además, se debe evaluar la capacidad biocontroladora en cultivos duales en medios sólidos y líquidos; Jiménez *et al.* (2008) realizaron un análisis molecular con marcadores RAPD, caracterizaron 12 aislamientos de *Trichoderma* agrupando las procedencias del país por especies; y Bautista *et al.* (2008) evaluaron los perfiles enzimáticos de *Trichoderma* en diferentes aislamientos.

Castro (2014) sugiere que los estudios a nivel de ADN (moleculares) son los más reproducibles. Actualmente, se requiere al menos un método molecular para caracterizar adecuadamente un aislado, y en la fase de registro de un producto internacionalmente, esta condición es requerida por países líderes en biocontrol.

Los estudios moleculares utilizados en esta investigación son los más comunes en la caracterización de hongos, en los que se crean cortes de enzimas de restricción en el

ADN, generando fragmentos de diferentes tamaños. Estos fragmentos se colocan en sondas específicas marcadas con un cromógeno o un isótopo radiactivo, que pueden o no acoplarse a los fragmentos creados por complementariedad de bases (hibridización) y luego se realiza una electroforesis. Castro (2014)

4.6. Análisis e interpretación de los resultados de la filogenia de las 10 cepas de *Trichoderma* sp.

Species/Abbrev	Sequence
1. Secuencia Consenso Muestra 1 Codigo CCECH Pasaje	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
2. Trichoderma pseudokoningii strain FSFCC5823	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
3. Trichoderma longibrachiatum strain SEHAFE22	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
4. Secuencia Consenso Muestra 2	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
5. Trichoderma pseudokoningii strain FSFCC5823 2 small subunit ribosomal RNA gene(2)	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
6. Trichoderma viride isolate OLPAINTS 1 small subunit ribosomal RNA gene	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
7. Trichoderma sp strain 18ASMA022 small subunit ribosomal RNA gene(2)	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
8. Secuencia Consenso Muestra 5 Codigo M18	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
9. Trichoderma harzianum isolate EOD AEe2 s small subunit ribosomal RNA gene(2)	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
10. Trichoderma pseudokoningii strain FSFCC5823 2 small subunit ribosomal RNA gene(2)	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
11. Trichoderma longibrachiatum strain SEHAFE22 internal transcribed spacer	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
12. Secuencia Consenso muestra 3 Codigo CCECH M11	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
13. Trichoderma harzianum isolate EOD AEe2 s small subunit ribosomal RNA gene	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
14. Trichoderma sp isolate y1176 1 internal transcribed spacer 1	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
15. Trichoderma bissetti strain SZMC20810 internal transcribed spacer	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
16. Trichoderma sp isolate SDAS204029 internal transcribed spacer 1	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
17. Trichoderma longibrachiatum internal transcribed spacer 1	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
18. Trichoderma pseudokoningii strain FSFCC5823 2 small subunit ribosomal RNA gene	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
19. Trichoderma sp isolate y1070 1 internal transcribed spacer 1	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
20. Trichoderma sp isolate y10145 1 internal transcribed spacer 1(2)	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
21. Trichoderma bissetti strain SZMC20810 internal transcribed spacer 1	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
22. Trichoderma sp strain 18ASMA022 small subunit ribosomal RNA gene	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
23. Trichoderma sp strain 18ASMA021 small subunit ribosomal RNA gene	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
24. Trichoderma sp strain CDCF2842 internal transcribed spacer 1	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
25. Trichoderma orientale strain CTCCSJ A SD32599 internal transcribed spacer 1	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
26. Trichoderma sp TA W1101 BC internal transcribed spacer 1	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
27. Trichoderma orientale strain S187 18S ribosomal RNA gene	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
28. Trichoderma sp isolate SDAS204029	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
29. Trichoderma sp isolate y10145 1 internal transcribed spacer 1	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
30. Secuencia Consenso Muestra 6 Codigo CCECH Ju13	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
31. Secuencia Consenso Muestra 9 Codigo CCECH THSL	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
32. Secuencia Consenso Muestra 4 Codigo CCECH Tung	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V
33. Trichoderma pseudokoningii strain FSFCC5823 2 small subunit ribosomal RNA gene	R I P ? A P A G G P T P N ? F F L S V A A P V

Ilustración 14: Cuadro de secuencias alineadas, convertidas a proteínas

Elaborado por: Calero, L. & Flores, V. 2024

4.6.1. Árbol filogenético de las 10 cepas aisladas de *Trichoderma* spp.

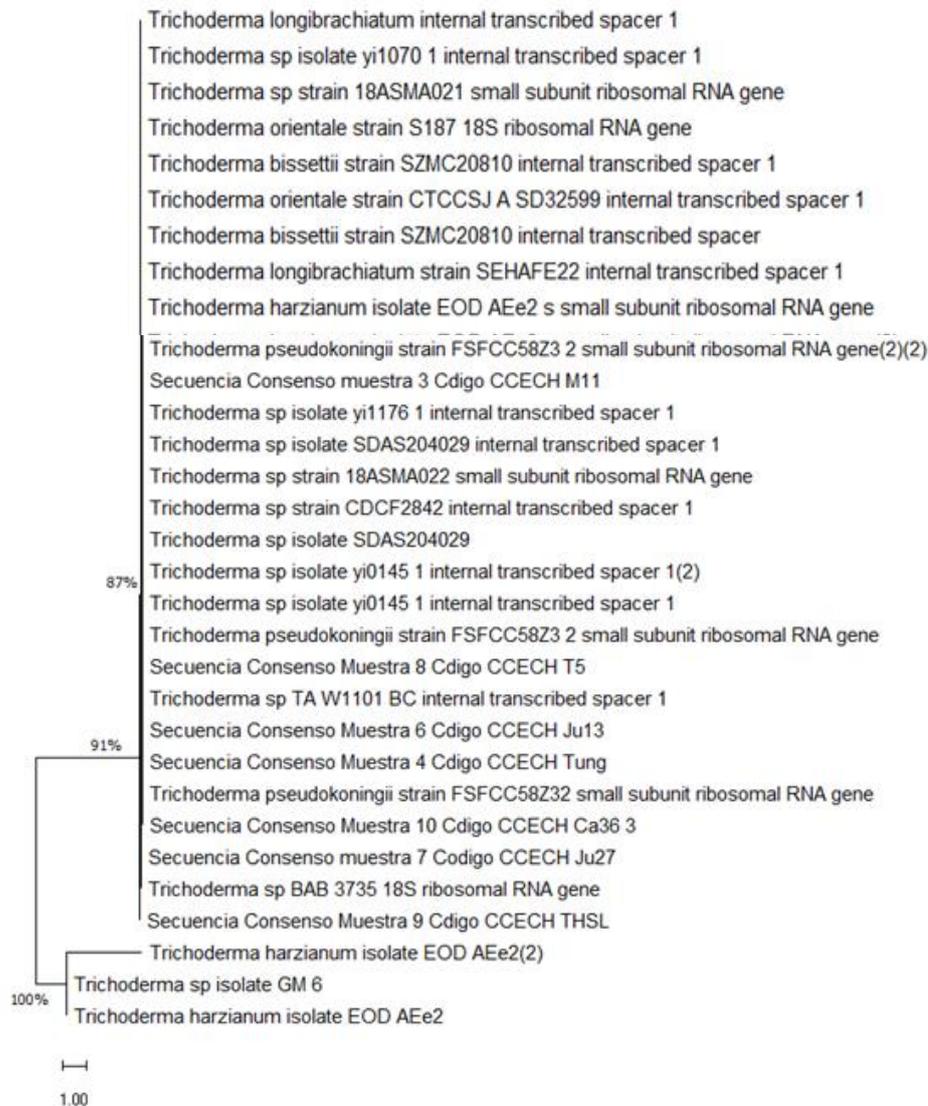


Ilustración 15: Árbol filogenético *Trichoderma* spp. en comparación con otras cepas

Elaborado por: Calero, L. & Flores, V. 2024

En el soporte de bootstrap la rama del 91% se puede observar la presencia de las cepas de *Trichoderma* correspondientes a los códigos CCECH-Tung, CCECH-Ju13, CCECH-Ju27, CCECH-T5, CCECH-THSL y CCECH-THSL, nos muestra una elevada relación filogenética entre estas especies, indicando que son genéticamente cercanas y que pueden compartir características genotípicas y fenotípicas similares.

El soporte de bootstrap en la rama del 87% indica una alta probabilidad de la muestra 3 correspondiente al código CCECH-M11 con la especie de *Trichoderma* sp isolate, sin embargo, en comparación con las cepas de anteriores hay una ligera disminución de confianza.

En la rama del 100% está presente la especie de *Trichoderma* sp. isolate GM6 y *Trichoderma harzianum*, esto nos muestra una certeza absoluta de relación filogenética entre las dos cepas, el alto nivel de confianza se debe a la conservación de secuencias que definen estas especies.

Este análisis filogenético nos proporciona una base fundamentada para seleccionar las cepas de *Trichoderma* con alto potencial de inhibir el crecimiento de *Mycosphaella fijensis*, por lo cual las cepas agrupadas en las ramas del 91 y 100% de bootstrap es posible que compartan mecanismos biológicos efectivos para inhibir el crecimiento organismo patógeno. Especialmente las especies de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma isolate* sp. GM6 se destacan por la alta relación filogenética, por ello estas cepas serían las mejores especies para la inhibición del crecimiento del patógeno, sin embargo las especies del presente estudio serían las cepas de *Trichoderma* Código CCECH-Tung, CCECH-Ju13, CCECH-Ju27, CCECH-T5, CCECH-THSL y CCECH-Ca36-3.

Este análisis filogenético nos ha permitido obtener una herramienta de gran valor para identificar las cepas con alto potencial biocontrolador, es te caso los valores de bootstrap 87%, 91% y 100% nos muestra un alto nivel de confianza en la relación filogenética de las especies de *Trichoderma* agrupadas, siendo esto una base futura para deducciones sobre la relación de trichoderma y su acción biocontroladora.

4.6.2. Árbol filogenético para las cepas aisladas de *Trichoderma* sp.

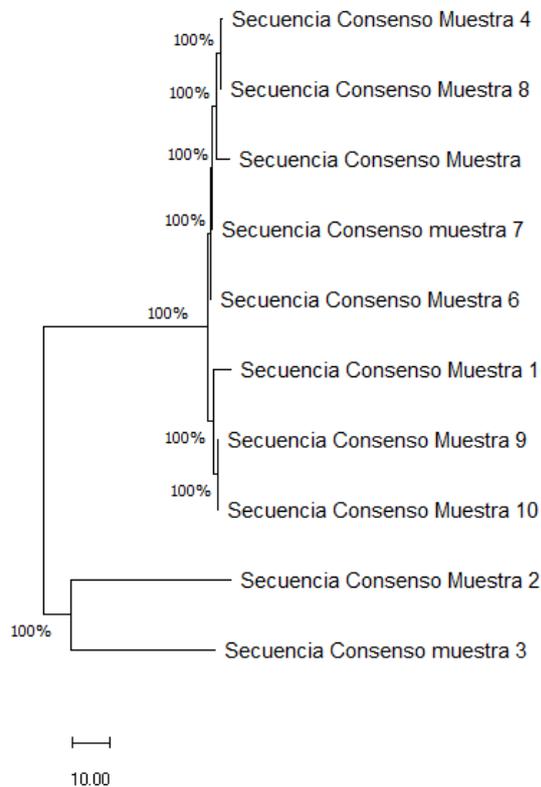


Ilustración 16: Árbol filogenético de las 10 cepas aisladas de *Trichoderma* spp.

Elaborado por: Calero, L. & Flores, V. 2024

El árbol filogenético realizado con las 10 cepas de *Trichoderma* sp, mediante la opción Likelihood, un algoritmo de alta verosimilitud y con un bootstrap de 1000 réplicas, siendo este un indicativo de que todas las cepas tienen un alto nivel de confianza en las diferentes agrupaciones, sin embargo, hay diferencias mínimas entre las mismas.

El valor de bootstrap es del 100% para todas las especies de *Trichoderma*, por ende, las secuencias génicas de todas están muy conservadas, las diferencias existentes que se observan en el árbol puede ser el resultado de diferencia en regiones o mutaciones puntuales en el genoma.

La elevada conservación genética de las cepas aisladas comparte características fenotípicas, mecanismos biológicos que son factores que pueden influir en la capacidad de inhibir el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*.

Las pequeñas diferencias de escala en el árbol también pueden deberse a factores específicos de la función biológica de cada especie aislada, afectando también su eficacia como biocontrolador de patógenos.

En resumen, las cepas de *Trichoderma* revelan una elevada conservación genética al tener un valor de bootstrap del 100% en todas las ramas, las mínimas diferencias genéticas pueden deberse a variaciones la funcionalidad de cada especie o la capacidad de biocontrolador contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

- De las 10 cepas aisladas de *Trichoderma* se identificó a nivel molecular de las cuales el 30% pertenecen a *T. harzianum*, el 30% a *T. pseudokoningii*, el 20% a *T. viride*, el 10% a *T. koningii* y el 10% a *T. longibranchiatum*.
- Se analizó el ritmo de crecimiento radial de las cepas antagónicas de *Trichoderma* spp. contra la cepa patógena *Mycosphaerella fijiensis*, demostrando que la cepa CCECH-THSL de *T. pseudokoningii* muestra la mayor velocidad de crecimiento.
- El análisis estadístico realizado después de hacer múltiples comparaciones y en base al test de Kruskal se observó una diferencia significativa en las cepas *Trichoderma pseudokoningii* A y *Trichoderma harzianum* C, mostrando una interacción específica que puede influenciar en poseer un mayor potencial como biofungicida.
- Aunque se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *M. fijiensis*, únicamente los tratamientos T3_P y T6_P mostraron un comportamiento distinto entre sí, lo que podría estar relacionado con las características específicas de estos tratamientos.

5.2. Recomendaciones

- Evaluar el uso de los hongos *Trichoderma* spp., en particular *Trichoderma harzianum*, en el biocontrol fitopatológico de otras especies vegetales, ya que es el hongo más antagónico en pruebas de laboratorio.
- Realizar ensayos in vivo para evaluar la capacidad de inhibición de crecimiento de las cepas que se destacó en el árbol filogenético, además de investigar los genes específicos que pueden estar relacionados a la actividad antagonista de *Trichoderma*.
- Aprovechar al máximo los microorganismos beneficiosos de nuestro país y sus diversos mecanismos de acción dentro de la agricultura. Esto servirá como base para la implementación de tecnologías en la producción de bioformulados a base de *Trichoderma*, manteniendo el cuidado del ambiente y la salud humana, alcanzando la tan anhelada agricultura sustentable.
- Se recomienda llevar a cabo ensayos de campo con cepas de *Trichoderma* spp. con los porcentajes más altos de inhibición para confirmar su eficacia en condiciones naturales y evaluar su impacto a largo plazo en el control de la sigatoka negra.

Bibliografía

- Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N., Barrales-Cureño, H. J., Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N., & Barrales-Cureño, H. J. (2019). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1259–1272. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V10I6.1326>
- Andrade-Hoyos, P., Rivera-Jiménez, M. N., Landero-Valenzuela, N., Silva-Rojas, H. V., Martínez-Salgado, S. J., & Romero-Arenas, O. (2023). Ecological and biological benefits of the cosmopolitan fungus *Trichoderma* spp. in agriculture: A perspective in the Mexican countryside. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(4), 366–377. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2023.06.005>
- Camilo, J., & Correa, G. (2017). *Desarrollo de modelos predictivos de Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis M. Morelet) en banano para la región de Urabá, Antioquia-Colombia*.
- Castillo-Arévalo, T. (n.d.). *Biological strategies for the management of Sigatoka (Mycosphaerella fijiensis M.) in plantain cultivation (Musa paradisiaca L.) AAB in Rivas, Nicaragua*. Retrieved May 31, 2024, from <https://orcid.org/0000-0001-6401-0142>
- Castro, R. I., Pesántez, M. I., Flores, V. I., Díaz, C. I., Castro, L. I., & Alvarado-Capó, Y. I. (2015). Efecto de cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de casa de cultivo. *Rev. Protección Veg*, 30(2), 133–138.
- Df, L.-R., Je, B.-C., -Hernández, S., -Juárez R B, Valadez-Lira, A., -Martínez, Q., & De La Fuente-Salcido, D. C. (2016). *IDENTIFICACIÓN MOLERCULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE FRESA POR PCR (ITS Y EF-1α) Y SUSCEPTIBILIDAD A BACTERIOCINAS DE Bacillus thuringiensis*. 1(1), 417–422. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- Espinoza Mendoza, A. (1986). *La sigatoka negra, amenaza para la producción bananera y platanera del Ecuador*.

<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1976>

- García Romero, I. A. (2019). Genómica de hongos fitopatógenos como herramienta para el desarrollo de estrategias de manejo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 3–5. <https://doi.org/10.15446/REV.COLOMB.BIOTE.V21N2.84132>
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., & Olivar, R. (2012). Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(1), 44–49. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000100009&lng=es&nrm=iso&tIng=es
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 35(1), 98–112. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Hilda, I., Ramírez, G., Whilly, I., Ramírez, S., Martín, B., Cantoral, T., Torres, B. E., & Aguila, D. (n.d.). *LABORATORIO DE ANTAGONISTAS SCB-SENASA MANUAL DE PRODUCCIÓN Y USO DE HONGOS ANTAGONISTAS*.
- Jaramillo Aguilar, E., Barrezueta-Unda, S., Luna Romero, E., & Castillo Herrera, S. (2017). Efecto biofungicida del gel de Aloe vera sobre *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra en Musa (AAA). *Scientia Agropecuaria*, 8(3), 273–278. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2017.03.10>
- Maza, M., Stazonelli, E., Allori, Yasem De Romero, M. G., & Autor, *. (n.d.). *Evaluación in vitro de aislamientos nativos de Trichoderma como agentes de biocontrol y promoción del crecimiento inicial en soja*.
- Mexicana De Fitopatología, S., México Arzate-Vega, A. C., Michel-Aceves, J. ;, Casimiro, A., Domínguez-Márquez, ;, Manuel, V., & Santos, ; (2006). Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet,

Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) in vitro e Invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 98–104. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224203>

- Molina, M. T. A., Núñez, V. V., Atauri, I. D. y D. de, & Corrales, M. C. (2016). Métodos y técnicas para el estudio de la Filogenia. *UAM Ediciones*. <https://doi.org/10.15366/EST.FILOGENIA2015>
- Mónaco, C., Stocco, M., Abramoff, C., & Kripelz, N. (n.d.). *Capacidad biocontroladora de Trichoderma sp. sobre la manifestación de la septoriosis del trigo*.
- Palacios, C. M., Regalado, J. O. G., & Plaza, J. A. M. (2019). Amenazas de las manchas foliares de Sigatoka (*Mycosphaerella* spp.) en la producción sostenible de banano en el Ecuador. *Revista Verde de Agroecología e Desenvolvimento Sustentável*, 14(5), 591–596. <https://doi.org/10.18378/RVADS.V14I5.6623>
- Pérez-Torres, E., Bernal-Cabrera, A., Milanés-Virelles, P., Sierra-Reyes, Y., Leiva-Mora, M., Marín-Guerra, S., & Monteagudo-Hernández, O. (n.d.). *EFICIENCIA DE Trichoderma harzianum (CEPA A-34) Y SUS FILTRADOS EN EL CONTROL DE TRES ENFERMEDADES FÚNGICAS FOLIARES EN ARROZ*.
- Poveda, J. (2021). Trichoderma as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. *Biological Control*, 159, 104634. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2021.104634>
- Pozo-Serrano, J., Reynaldo-de la Cruz, E., Teresa-Cardoso, M., Rodríguez-Pérez, A., García-Pupo, J., Pérez-Tejeda, Y., Guzman-Alberteris, L., Lobaina-Lobaina, E., Holguín Calle, de, & Maceo Reparto El Llano, ra. (2019). Antagonic effectiveness in vitro of Trichoderma sp. in front of Stemphylium lycopersici. *Cultivos Tropicales*, 40(3), 4. <http://ediciones.inca.edu.cu>
- Rica, C., Rodríguez-García, D., & Vargas-Rojas, J. (n.d.). *EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON Trichoderma SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO DEL TOMATE (Solanum lycopersicum)*. Retrieved June 1, 2024, from www.mag.go.cr/revagr/index.htmlwww.cia.ucr.ac.cr

- Rivera-Méndez, W., Meneses-Montero, K., Zúniga-Vega, C., Brenes-Madriz, J. A., Rivera-Méndez, W., Meneses-Montero, K., Zúniga-Vega, C., & Brenes-Madriz, J. A. (2016). Antagonismo de *Trichoderma* sp. ante el patógeno *Stromatinia cepivora* en el cultivo de cebolla. *Revista Tecnología En Marcha*, 29(7), 22–30. <https://doi.org/10.18845/TM.V29I7.2702>
- Torres-De La Cruz, M., Ortiz-García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & De La Cruz-Pérez, A. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 947–961. <https://doi.org/10.1016/J.RMB.2015.07.012>
- Zambrano Bullones, K., Dávila, M., & Castillo, M. A. (2002). Detección de fragmentos de ADN de hongos y su posible relación con la síntesis de proteínas de actividad entomopatógena. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 19(3), 185. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037878182002000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- DRUZHININA, I., KOPCHINSKIY, KUBICEK. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* Vol. 3. 2003, Estados Unidos, pp. 47:55-64.
- GUIGÓN-LÓPEZ C., GUERRERO-PRIETO V., VARGAS-ALBORES F., CARVAJAL-MILLÁN G., ÁVILA-QUEZADA D. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatogenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 28, núm. 2, 2010, México, pp. 87-96.
- GÚZMAN, M. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. 2011 <http://www.infoagro.net/programas/Ambiente/pages/adaptacion/casos/Sigatoka.pdf>
- HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*. 2000, Estados Unidos, pp. 84: 377-393.
- HARMAN, GE., HOWELL, RH., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M.

Trichoderma species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. Vol. 2. 2004, pp. 43-56.

- HARMAN, GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma harzianum* spp. Phytopatology, Vol. 96. 2006, Estados Unidos, pp. 190-194.
- HOWELL, CR. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease, Vol. 87, 2004, Estados Unidos, pp. 1, 4-10.
- HOWELL. Aplicación de *Trichoderma*, modo de acción y potencial como un agente de control biológico de hongos patógenos de la planta. Revista de Protección Vegetal. Vol. 28. Abril 2003, Cuba, pp. 45-48.
- MANZO, G. Diversidad Genética De *Mycosphaerella Fijiensis* Morelet En Plátano Enano Gigante (*Musa Acuminata* Aaa) Cultivado Con Diferente Manejo. (Tesis) (PHD en Biotecnología). Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y agropecuarias, Colima-México. 2011, pp. 35-49. <http://bvirtual.ucol.mx/textoscompletos.php?autor=759&id=5608>. 2014-01-14
- MARÍN, DH; ROMERO, RA; GUZMÁN, M; SUTTON, TB. Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. Plant Disease. Vol. 87, 2003, Estados Unidos, pp. 208-222
- MARTÍNEZ, B., REYES Y. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz; Rev. Protección Veg. Vol. 23 2008, Cuba, pp. 56-58.
- MOREANO, J. Implementación de una Nueva Variedad de Banano para Incrementar la Productividad del Cultivo. (Tesis) (Ingeniero Agropecuario). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil-Ecuador, 2009, pp. 36-40. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/10283>.
- PÉREZ, L. Morfología de las especies de *Mycosphaerella* asociadas a manchas de las hojas en *Musa* spp. Redalyc. Vol. 6. Junio 2002, Cuba, pp. 23-36.
- PESÁNTEZ, M. Fichas Técnicas. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Laboratorio de Fitopatología. 2003

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

