



**UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS**

**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

BIOPRODUCTO A BASE DE UNA CEPA NATIVA DE *Trichoderma harzianum* Rifai PARA EL MANEJO DE LA SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) EN BANANERAS ORGÁNICAS

Aspirante: MSc. Rosa del Pilar Castro Gómez

Tutora: Dr. C. Yelenys Alvarado-Capó

SANTA CLARA, CUBA

2015

Nadie es dueño de su felicidad, por eso no entregues tu alegría, tu paz, tu vida en las manos de nadie, absolutamente de nadie. Somos libres, no pertenecemos a nadie y no podemos querer ser dueños de los deseos, de la voluntad, o de los sueños de quienquiera que sea. La razón de tu vida eres tú mismo. Tu paz interior es la meta de tu vida, cuando sintieras un vacío en el alma, cuando creyeras que aún te está faltando algo, aún cuando tengas todo, envía tus pensamientos hacia tus deseos más íntimos y busca la divinidad que existe en ti. Deja de poner la felicidad cada vez más lejos de ti. No te pongas objetivos que no estén al alcance de tus manos, abraza a los que estén a tu alcance hoy. Deja de pensar mal de ti mismo y sé tu mejor amigo siempre. Sonreír significa aprobar, aceptar, felicitar. Entonces abre una sonrisa para aprobar el mundo que te quiere ofrecer lo mejor.

Agradece todo lo que está en tu vida en este momento, inclusive el dolor. Nuestra comprensión del universo aún es muy pequeña para juzgar lo que queremos que sea nuestra vida. La grandeza no consiste en recibir honras, sino en merecerlas.

El amor de Dios es como un océano; puedes ver dónde comienza pero jamás dónde acaba, quiero dedicar con todo mi amor este trabajo a Dios por ser la guía que nunca me falta en esta vida que es vivir a mi manera, quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerza para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis padres y familia que me cuidan con cariño, que me indican el mejor camino, que me enseñan sobre el verdadero amor, que me perdonan cuando es preciso, que me enseñaron que tengo alas para volar, en los sueños me ayudan a descansar, también me muestran la realidad que tengo que enfrentar sin nunca, por nada, renunciar y que podemos ser más humanos y más agradecidos con la vida, por todo lo que nos ha dado.

Los ángeles existen pero a veces no tienen alas, les llamamos entonces amigos, para ellas y ellos, especialmente Marcita, pues siempre me ofreció su hombro para reclinar mi cabeza y cuando estuve abatida por el cansancio del camino, me infundió ánimo para que pueda descansar y recobrar fuerzas para seguir caminando.

Solo existen dos días en el año en que no se puede hacer nada. Uno se llama AYER y otro MAÑANA, por lo tanto hoy es el día ideal para, creer, hacer y principalmente AGRADECER:

Para el logro del triunfo siempre ha sido indispensable pasar por la senda de los sacrificios, a toda mi familia por su apoyo, comprensión y amor incondicional.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a todas sus autoridades, a mi amigo exRector, Dr. Romeo Rodríguez Cárdenas (+), que siempre confió y apoyó mis proyectos e ideas y a pesar de su ausencia lo llevaré siempre en mi corazón. A la Ingeniera Rosita Pinos, Rectora, amiga, mujer de grandes ideales, por todo ese apoyo a cada uno de mis requerimientos oportunamente. Al Ingeniero Fernando Romero, Decano de la Facultad de Recursos Naturales, por creer siempre en mí desde que fui su estudiante y a lo largo de toda mi trayectoria profesional.

No hay espejo que mejor refleje la imagen del hombre que sus palabras, quisiera expresar mi sincero agradecimiento al Gobierno de Ecuador a través de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENESCYT), por la beca otorgada para mis estudios de acuerdo con la Convocatoria Abierta 2011 y darnos la oportunidad a los profesionales de las universidades de aportar al desarrollo socioeconómico del país con calidad y pertinencia en base del conocimiento científico y tecnológico para lograr el Buen Vivir.

A la Dra. Yelenys Alvarado-Capó, pues sus acciones inspiran a otros a soñar más, a aprender más, a hacer más, y a cambiar más, porque a lo largo de todo este tiempo, a más de hacerlo como profesional me ha formado como persona y he podido encontrar en ella una amiga.

Sí hay una facultad de nuestra naturaleza que puede considerarse maravillosa, esa es la memoria, por ello a los Doctores: Leyanys García, Novisel Veitia , Idalmis Bermúdez, Boris

Chong, Lourdes García, Manuel de Fera, Raúl Borbón, Rafael Gómez Kosky, porque a más de su amistad y solidaridad me impartieron mucho conocimiento.

La grandeza de una persona se puede manifestar en los grandes momentos, pero se forma en los instantes cotidianos, Martita y Osmildo gracias por cada día compartido aquí en la Biblioteca, donde siempre tuve asidero a mis dudas y preocupaciones.

A Mayra Acosta, Mileydy Cruz, Tatiana Pichardo, Berkis Roque, Jenny Padrón, Eilyn Mena, que a pesar de estar tan lejos siempre me hicieron sentir como una más del grupo.

A la Dra. Marcía Pesántez, mi hermana y amiga quien ha soportado y tolerado mis ausencias y mi carácter, pero sobre todo me apoyó con su cariño siempre y que sabiamente dice: "Confía en el tiempo, que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades".

Al Ingeniero Paúl Alberto Jínez Llangari, estadístico de la Facultad de Recursos Naturales, que a pesar de todo su trabajo, supo encontrar espacio para mis múltiples interrogantes.

A Horthen, a quien considero una hermana y un extraordinario ser humano, ha estado desde hace muchos años en las buenas y en las malas, demostrando su amor hacia los míos, incluso a costa de su propio tiempo, gracias querida amiga.

Para el colectivo del Hotel Los Sauces en nombre de Mercedes Oliveira y Yudeisi Feitó, buenas personas que suplieron muchas de mis limitaciones a costa de sus propias limitaciones con gran cariño y amor de hermanas, gracia Meche y Yuya, siempre las querré.

Es común que fracase quien acostumbra a elegir lo fácil, cuando debe elegirse lo correcto.

MUCHÍSIMAS GRACIAS A TODOS Y TODAS
Rosita

SÍNTESIS

El control biológico de Sigatoka negra en bananeras orgánicas bajo las condiciones ambientales de Ecuador es un problema no resuelto. Este trabajo se propuso desarrollar un bioformulado a base de una cepa nativa de *Trichoderma* spp. Se evaluó la velocidad de crecimiento *in vitro* de 100 cepas de la colección de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo de las cuales se seleccionaron 10. A estas se les determinó su antagonismo *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis* y se identificaron en base a su caracterización morfológica, cultural y molecular. A partir de los resultados se seleccionó una cepa la cual se multiplicó en fermentación sólida con sustrato de arroz en frascos de vidrio y en un biorreactor para obtener una formulación en polvo seco. En casa de cultivo se determinó el efecto de esta formulación y de otra elaborada a partir de esta con adyuvantes (formulado líquido) y se seleccionó la de mayor eficacia en el control de la enfermedad. Posteriormente, se determinó su viabilidad en el tiempo. En experimentos de campo durante dos ciclos de cultivo se validó su potencial de biocontrol, se hizo un análisis económico y se determinó su compatibilidad con otros productos empleados para la protección de las plantas. Finalmente, se determinaron los puntos críticos del proceso y se elaboró un sistema de control de la calidad. Con todos los resultados y cumpliendo con los requisitos previstos en la legislación se presentó el expediente para el registro del bioproducto en el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Ecuador. Se identificaron tres especies en las 10 cepas seleccionadas con antagonismo *in vitro* frente a *M. fijiensis*: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. pseudokoningii*. Se comprobó que la actividad antagónica estaba relacionada con competencia por espacio, nutrientes y micoparasitismo. Se seleccionó la cepa *T. harzianum* CCCh-p1 para continuar los estudios. En casa de cultivo se obtuvo una eficacia del 68,8% para la formulación de polvo seco y de 97,6% para el formulado líquido. El estudio de viabilidad mostró que el tipo de formulación influyó en la viabilidad de los conidios en el tiempo a las temperaturas ensayadas. En campo el formulado líquido redujo el índice de infección y tuvo una eficacia entre 18,0 y 24,6%. Además, estimuló el crecimiento de las plantas. El análisis económico demostró la factibilidad de aplicar 5,0 L ha⁻¹, pues la tasa de retorno marginal y los beneficios netos fueron superiores y además se comprobó su compatibilidad con productos empleados para la protección de plantas. Se elaboró un sistema de control de la calidad al proceso y al producto final con 25 puntos de control. Se logró el registro del bioproducto, con la marca TRIKOFUN y número de registro MAG: 020611018, lo cual permite disponer de un bioproducto a partir de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 con efecto en campo sobre Sigatoka negra que puede aplicarse en el cultivo orgánico de bananos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Generalidades del cultivo de banano	5
2.1.1 Importancia económica y alimentaria	5
2.1.2 Banano orgánico en Ecuador	6
2.1.2.1 Definición	6
2.1.2.2 Prácticas agrícolas en el cultivo de banano orgánico en Ecuador	6
2.1.2.3 Productividad de banano orgánico en Ecuador	8
2.1.3. Aporte del subsector bananero al desarrollo sostenible de Ecuador	10
2.1.4 Enfermedades en <i>Musa</i> spp.	11
2.2 Sigatoka Negra	12
2.2.1 Agente causal	12
2.2.2 Daños económicos	13
2.2.3 Historia y distribución de la Sigatoka negra	15
2.2.4 Medidas de control	15
2.2.4.1 Control químico	15
2.2.4.2 Variedades resistentes	16
2.2.4.3 Manejo cultural	17
2.2.4.4 Control biológico	17
2.2.4.5 Manejo integrado	19
2.3 <i>Trichoderma</i> spp.	21
2.3.1 Estado sexual	21
2.3.2 Estado asexual	21
2.3.3 Especies	22
2.3.4 Mecanismos de acción	24
2.3.5 Principales patógenos que controla	25
2.3.6 Bioproductos a base de <i>Trichoderma</i> spp.	27
2.3.6.1 Control de calidad en la producción de bioproductos	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 Selección de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp.	33
3.1.1 Crecimiento radial	33
3.1.2 Antagonismo <i>in vitro</i> frente a <i>M. fijiensis</i>	33
3.1.3. Identificación	34
3.2 Formulación de bioproducto	37
3.2.1 Proceso fermentativo	37
3.2.2 Selección de la formulación	39

3.2.2.1 Eficacia en casa de cultivo	39
3.2.2.2 Viabilidad de las formulaciones en el tiempo	41
3.3 Validación del potencial de biocontrol	41
3.3.1 Ensayo de eficacia en campo	41
3.3.2 Análisis económico	43
3.3.3 Compatibilidad con productos empleados en bananeras orgánicas	44
3.4 Sistema de control de la calidad y registro del bioproducto	45
3.4.1 Control de la calidad	45
3.4.2 Elaboración de documentación para el registro del bioproducto	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1 Selección de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp.	48
4.1.1 Crecimiento radial	48
4.1.2 Antagonismo <i>in vitro</i> frente a <i>M. fijiensis</i>	50
4.1.3. Identificación	52
4.2 Formulación de bioproducto	59
4.2.1 Proceso fermentativo	59
4.2.2 Selección de la formulación	61
4.2.2.1 Eficacia en casa de cultivo	61
4.2.2.2 Viabilidad de las formulaciones en el tiempo	66
4.3 Validación del potencial de biocontrol	70
4.3.1 Ensayo de eficacia en campo	70
4.3.2 Análisis económico	76
4.3.3 Compatibilidad con productos empleados en bananeras orgánicas	77
4.4 Sistema de control de la calidad y registro del bioproducto	80
4.4.1 Control de la calidad	80
4.4.2 Elaboración de documentación para el registro del bioproducto	87
Discusión general	93
5. CONCLUSIONES	98
6. RECOMENDACIONES	99
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8. ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

El banano es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, con ventas de más de 5 billones (US) por año, con una producción mundial concentrada en África (11,0%), América Latina y Caribe (ALC) (34,0%) y Asia (54,0%). Sin embargo, ALC sobresale de las otras regiones por ser responsable del 90,0% del banano de exportación. El primer lugar, en producción, lo ocupa Ecuador, seguido por Costa Rica (CORPEI, 2011; AILA, 2014). Alcanza un récord de más de 200 millones de cajas de 18,14 kg netos (Páez y Barrientos, 2010; Miranda, 2011). Su cultivo se realiza en 20 provincias del territorio continental de las cuales la Costa aporta el 89,0% de la producción nacional, la Sierra el 10,0% y el Oriente el 1,0% (Guzmán, 2012; Pro Ecuador, 2013).

En 2012, el sector bananero ecuatoriano exportó 2 078 239,38 millones de dólares por concepto de divisas y 5 196 065,09 de toneladas lo que ubica al banano como el primer producto de exportación del sector privado del país y uno de los principales contribuyentes al fisco. Entre los productos no tradicionales, las exportaciones ecuatorianas de banano, representan el 45,34% del valor FOB (del inglés: *Free On Board*, valor de venta de los productos en su lugar de origen más el costo de los fletes, seguros y otros gastos necesarios para hacer llegar la mercancía hasta la aduana de salida) exportado y el 87,14% de las toneladas exportadas (AEBE, 2013; Pro Ecuador, 2013).

Dentro de la economía, la exportación bananera representa también el 2,0% del Producto Interno Bruto (PIB) (valor monetario total de la producción de bienes y servicios de uso final generados por los agentes económicos durante un determinado período de tiempo) general, 26,0% del PIB agrícola, 8,0% de las exportaciones generales, 27,0% de las exportaciones agropecuarias y 20,0% de las exportaciones no petroleras. El 95,0% de la producción ecuatoriana se exporta y llega a 43 mercados a nivel mundial. Las inversiones en el área de producción alcanzan un estimado de \$ 4 000 millones de dólares entre plantaciones cultivadas de banano, infraestructura, emparadoras y puertos, por lo cual es una de las más importantes por el monto y el alcance que tiene en la economía nacional (AEBE, 2013; Pro Ecuador, 2013).

En lo que se refiere a banano orgánico, del año 2006 a 2012, Ecuador pasó de 120 000 a 125 000 cajas a la semana por lo cual conserva el segundo lugar en lo que a producción de este tipo de fruta se refiere a nivel de América Latina. El primer lugar lo ocupa República Dominicana con 160 000 cajas/semana y en tercer lugar se ubica Perú con 25 000 cajas/semana (FAOSTAT, 2014). La necesidad de consumir productos sanos y nutritivos hace que el banano orgánico se convierta en una de las

alternativas productivas que más tiende a crecer en el mundo, de modo que Ecuador puede convertirse en el líder mundial (MAGAP, 2012).

La enfermedad más importante de los bananos y plátanos (*Musa* spp.) es la Sigatoka negra; ocasionada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis* Morelet [Deighton]) (Marín *et al.*, 2003), que origina la reducción del área foliar funcional en la planta y la muerte prematura de grandes áreas de la superficie de la hoja, lo que resulta en una marcada reducción del área fotosintética de la planta, que no le permite al fruto alcanzar su desarrollo y cuando lo hace se presenta madurez prematura por efecto de los metabolitos del hongo (Craenen, 2003; Marín *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2012). Como consecuencia final se ha comprobado una disminución de la producción de fruta en un 38,0% (Marín *et al.*, 2003; AEBE, 2012).

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 (Henderson *et al.*, 2006).

Esta enfermedad se controla principalmente con la aplicación de fungicidas por medio de avionetas, helicópteros u otros medios (Nakyanzi, 2002; Agronet, 2012); 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 (Stover, 1980; Henríquez *et al.*, 1997; Guédez *et al.*, 2009). Es una constante, en la gran mayoría de cultivos de importancia económica, el uso de plaguicidas como única estrategia de control de la enfermedad, lo cual genera un incremento en las mutaciones del componente patogénico, por consiguiente plasticidad genómica y mayor resistencia a los agroquímicos comercialmente utilizados (Torres *et al.*, 2011).

Para el cultivo orgánico del banano en Ecuador, de acuerdo con el Plan de Manejo Ambiental del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca y AGROCALIDAD (MAGAP, 2011), para certificar una plantación de banano como orgánica, es obligatorio mejorar el sistema de drenajes, optimizar los programas de nutrición del cultivo, considerar los análisis de raíces, suelo y foliares, incluir como prioridad el manejo de materia orgánica y el nitrógeno, la introducción y manejo de leguminosas como coberturas, integrar de mejor forma estrategias para regular con eficiencia el comportamiento de la Sigatoka negra y la utilización de cepas de microorganismos nativos que no sean modificados genéticamente (Pro Ecuador, 2013).

El uso de agentes de control biológico para prevenir o controlar enfermedades en plantas cultivadas, es una alternativa sustentable que ha mostrado efectividad en gran

número de casos (Bettiol *et al.*, 2014). El hongo *Trichoderma* spp. 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 (Lorito *et al.*, 2010; Guédez *et al.*, 2012; Castrillo *et al.*, 2014). Además, tiene altas tasas de crecimiento, capacidad para adaptarse a condiciones de estrés y altas temperaturas (Montero-Barrientos *et al.*, 2010).

Hay referencias científicas que indican que tiene efecto antagonista sobre hongos del suelo como *Phytophthora capsici* Leo, *Pythium ultimum* Trow, *Fusarium oxysporum* Schltdl, *Sclerotium* sp., entre otros (Ezziyyani *et al.*, 2004; Djonovié *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2007). También se considera agente de control biológico de enfermedades causadas por hongos en las partes aéreas de las plantas y enfermedades postcosecha (Elad, 2000; Galleti *et al.*, 2008).

A nivel mundial existen fórmulas comerciales basadas en el uso de especies de *Trichoderma* para el control de hongos fitopatógenos, principalmente de suelo. Sin embargo, estos bioformulados no tienen el mismo efecto en todas las regiones agrícolas debido a las diversas condiciones ambientales que existen en la naturaleza, las cuales pueden aumentar o disminuir su efectividad. Por esta razón, es necesaria la búsqueda de cepas nativas de *Trichoderma* que tengan efecto en el control de hongos patógenos de plantas bajo las condiciones ambientales de Ecuador, así como identificar los mecanismos utilizados.

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 (Arzate-Vega *et al.*, 2006, Cobos, 2010) que han evidenciado la posibilidad de su uso en el control de la enfermedad.

El combate biológico en campo ha sido menos exitoso para el caso de enfermedades foliares, como las Sigatokas (Guzmán *et al.*, 2013). Lo anterior está relacionado con las características del filoplano, que se puede considerar un ambiente hostil para los microorganismos antagonistas, debido a que su superficie está expuesta a fuertes cambios de temperatura y humedad en períodos cortos de tiempo (ambiente inestable con altas condiciones de estrés) y a su baja y heterogénea disponibilidad de nutrientes

como carbohidratos y proteínas (Ceballos *et al.*, 2012). No obstante, en el filoplano se encuentran microorganismos colonizadores que pueden actuar como agentes de control biológico (González *et al.*, 1996; Carr, 2009; Ceballos *et al.*, 2012; Guzmán, 2012; Carr, 2013), por lo que el empleo de una formulación a base de *Trichoderma* para el control de agentes patógenos como *Mycosphaerella fijiensis*, disminuiría costos de producción destinados a la protección y se reducirían los impactos negativos sobre el medio ambiente y la salud debido a las aplicaciones sostenidas en las áreas bananeras.

Teniendo en cuenta estos aspectos, se propuso la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis: A partir de seleccionar cepas nativas de *Trichoderma* spp. con antagonismo *in vitro* frente a *Mycosphaerella fijiensis* se podría desarrollar una formulación con eficacia en el control de la enfermedad en casa de cultivo y campo que permitiría disponer de un bioproducto registrado para emplearse en banano orgánico.

Para cumplir esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general: Desarrollar un bioformulado a base de una cepa nativa de *Trichoderma* spp. que pueda emplearse en el manejo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en bananeras orgánicas.

Objetivos específicos:

1. Seleccionar cepas nativas de *Trichoderma* spp. con antagonismo *in vitro* frente a *M. fijiensis*.
2. Obtener una formulación a base de esporas del antagonista.
3. Validar el potencial de biocontrol de la formulación en condiciones de campo.
4. Elaborar un sistema de control de la calidad y la documentación para el registro del bioproducto.

La **NOVEDAD CIENTÍFICA** de este trabajo, está en el desarrollo de un bioproducto para el manejo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) registrado en el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Ecuador.

Desde el punto de vista **PRÁCTICO** se pone a disposición de la comunidad científica una colección de cepas de *Trichoderma* spp. con efecto sobre *M. fijiensis*, adecuadamente identificadas y caracterizadas. Además, se proporciona a los productores de banano ecuatorianos un bioproducto que puede ser incluido en los esquemas de manejo integrado de la enfermedad.

Este trabajo, además, es una contribución al conocimiento sobre la actividad de *Trichoderma* spp. asociada a *Musa* spp. y sus mecanismos frente a *M. fijiensis*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Generalidades del cultivo de banano

2.1.1 Importancia económica y alimentaria

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) se cultivan en todas las regiones tropicales y tienen una importancia fundamental para las economías de muchos países en desarrollo. En términos de valor bruto de producción, el banano es el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo, después del arroz (*Oryza sativa* L.), el trigo (*Triticum aestivum* L.) y el maíz (*Zea mays* L.). Como producto de exportación, el banano contribuye de forma decisiva a las economías de muchos países de bajos ingresos y con déficit de alimentos, entre los que figuran Ecuador, Honduras, Guatemala, Camerún y Filipinas (FAO, 2010).

Las inversiones e industrias de la actividad bananera en Ecuador generan trabajo para más de un millón de familias, lo cual es más de 2,5 millones de personas localizadas en nueve provincias. Sumadas totalizan más de cuatro mil ochocientos millones de dólares (CORPEI, 2011; Industria Bananera Ecuatoriana, 2011; AEBE, 2012).

Ecuador ofrece al mercado internacional diferentes cultivares, Gros Michel, Grande Naine, Dwarf Cavendish entre otras (Tabla 1). El país cuenta con aproximadamente 140 000 hectáreas plantadas y existe disponibilidad de la fruta todo el año. El grupo más representativo de los productores orgánicos del Ecuador, está conformado por los productores que tienen como rubro principal al banano, que en conjunto cuentan con 10 000 hectáreas certificadas y alrededor de 50 000 hectáreas en transición a la Agricultura Orgánica, cuya producción se expende principalmente en los mercados de la Unión Europea (CORPEI, 2011).

Tabla 1. Clasificación de las especies de banano y plátano cultivadas en Ecuador.

Especies	Grupo	Subgrupo	Cultivares	Otros Nombres
<i>Musa acuminata</i>	Diploide AA	Sucrier	Baby banana	Lady's Finger
		Gros Michel	Gros Michel	Orito
	Triploide AAA	Cavendish	Grande Naine	Gran enano
			Dwarf Cavendish	Cavendish
			Valery	Robusta
			Lacatan	Filipino
			Williams	
<i>Musa balbisiana</i>	Triploide AAB	Plantain	French Plantain	Dominico
			Horn Plantain	Barraganete
			Dominico Harton	
			Maqueño	
			Limeño	
	Triploide ABB	Plantain	Cuatrofilios	
			Pelipita	
	Tetraploides AAAB		FHIA- 4	
			FHIA- 21	

Fuente: Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, PRO ECUADOR (2013)

2.1.2 Banano orgánico en Ecuador

2.1.2.1 Definición

Banano orgánico es una fruta de origen tropical, 100,0% cultivado sin el uso de productos químicos sintetizados y fertilizantes químicos, en ninguna etapa de su producción, así como tampoco en los suelos donde son cultivados los productos o las materias primas que forman parte del producto. Las técnicas de cultivo se concentran principalmente en optimizar la fertilidad de la tierra, así como en el manejo biológico-natural para el tratamiento de enfermedades y plagas. Las características del producto deben tener superioridad y legalidad en todo el proceso de producción y ser rastreables. El banano orgánico es un producto diferenciado (en relación con los productos convencionales), que se dirige a un nicho específico de mercado. Todo esto forma parte de la certificación orgánica, que para tener validez legal debe ser acreditada por un organismo autorizado (FAOSTAT, 2012; Falconí, 2014).

La transición de cultivo convencional a orgánico, puede durar de 1 a 3 años por el cambio en manejos agronómicos. En el intento de describir más claramente el sistema orgánico se usan también términos como «biológico» y «ecológico». Los requisitos para los alimentos producidos orgánicamente difieren de los relativos a otros productos agrícolas en el hecho de que los procedimientos de producción son parte intrínseca de la identificación y etiquetado de tales productos, así como de las declaraciones de propiedades atribuidas a éstos (FAO/OMS, 2010).

La producción de banano orgánico en Ecuador, se sustenta en tres ejes: *sostenibilidad económica de los productores* (precios justos y suficientes para todos los actores a lo largo de la cadena y mayor información al consumidor), *sostenibilidad social* (salarios dignos, promoción de la equidad de género, respeto a los derechos laborales) y *sostenibilidad ambiental* (buenas prácticas para bajar los impactos negativos de la emisión de carbono) (CORPEI, 2011; INFOSTAT, 2012).

2.1.2.2 Prácticas agrícolas en el cultivo de banano orgánico en Ecuador

Las principales prácticas agrícolas son: selección del terreno (apropiada limpieza, mecanización e implementación de drenajes y canales de riego), semilla (sistema de propagación local e importado), nutrición (compost, vermicompost, té de compost, té de ortiga *Urtica urens* L., harina de higuera *Ricinus communis* L.) (MAGAP, 2014). A continuación se describen las principales actividades, que aseguran, para los productores orgánicos una certificación que les permita exportar con un sello a mercados internacionales bajo los estándares de precio justo.

Deshije – Consiste en la eliminación de retoños o hijos que no son productivos, mantener únicamente una secuencia entre la madre, el hijo y un nieto, y seleccionar solo las mejores plantas para la producción (AEBE, 2013).

Deshoje – Comprende la eliminación de hojas no funcionales.

Riego y Ferti-riego – Proporcionan a los cultivos todos los elementos nutricionales que son requeridos para alcanzar los niveles óptimos de productividad a través del sistema de riego, para lograr una alta eficiencia en los productos utilizados, minimizando o eliminando el uso de químicos. Puede ser por gravedad, por goteo, por micro-aspersión y por aspersión (Grupo Quirola, 2014).

Calidad preventiva – Una vez desarrollada la fruta, se cuida bajo procedimientos establecidos de control de calidad que permiten la obtención de banano sano, limpio y con excelente calidad. Esta es la etapa más importante de la producción y comprende: enfunde, desflore, protección de gajos, apuntalamiento, deschive (quitar los gajos o manitos que no sirven), y limpieza de brácteas del racimo.

Control fitosanitario – Todos los productos que aplican en sus cultivos proceden de fabricantes reconocidos, son de excelente calidad y garantizados para la protección del medio ambiente (MAGAP, 2014).

Procesamiento

Cuando el fruto ha completado su madurez fisiológica, se cosecha con mucho cuidado para evitar daños, y luego se transporta por líneas de cable hacia las plantas empacadoras para ser calificado bajo los parámetros exigidos por los clientes.

La fruta se limpia y clasifica dentro de las piscinas de procesamiento para eliminar el látex natural. Los gajos limpios o “*Clusters*” se pesan y luego reciben un recubrimiento protector contra agentes patógenos, lo que garantiza la preservación de su calidad y que al consumidor le llegue un producto completamente sano. Finalmente, la fruta se empaca de acuerdo con los requerimientos del mercado y se transporta a los puertos de Guayaquil o Puerto Bolívar para ser exportada a clientes en diferentes partes del mundo o entregada a clientes locales (Grupo Agrícola Prieto, 2014; Grupo Quirola, 2014).

Certificaciones orgánicas

En la última década han aparecido en el mercado diferentes entes certificadores de banano amigable, orgánico, biodinámico y otros, los cuales al incrementar en número han hecho necesaria la creación de normativas nacionales e internacionales para regular su uso (FAO, 2013). Esto último es especialmente importante en el caso de la

certificación de banano orgánico, donde las agencias de certificación deben ser acreditadas a escala gubernamental, nacional, internacional (Unión Europea, USDA, Codex Alimentarius) e internacional no-gubernamental (IFOAM) (FAO, 2012).

Uno de estos cambios ha sido el desarrollo de un mercado preferencial para productos y servicios que garanticen al consumidor que en su producción se protegió el ambiente, o que tienen niveles de contaminantes menor que los productos convencionales. Hoy en día se puede encontrar en el mercado banano con certificaciones como ISO-14001, Orgánico, Eco-OK, NutraClean Systems, Rainforest Alliance, Comercio Justo (FAO, 2012), que garantizan al consumidor que el sistema de producción utilizado siguió las normas establecidas por cada una de esas agencias. La certificación tiene la ventaja de facilitar la comercialización de estos productos a través de un reconocimiento por los consumidores, ya sea a través de la preferencia por el producto en el mercado o por la disposición de pagar un sobreprecio por estos.

Las normas para certificación fueron desarrolladas en trabajo conjunto por productores, grupos conservacionistas, científicos y representantes legales. Las normas deben ser consideradas como parámetros generales en torno de los cuales los grupos regionales deben desarrollar sus propias normas adaptadas a las condiciones locales y específicas de cada cultivo (Rainforest Alliance, 1998).

Algunos productores ecuatorianos tienen la certificación GLOBALG.A.P. (*Good Agricultural Practices*) de orgánico de parte de agencias reconocidas en los Estados Unidos de América y aprobado por el "*Programa Orgánico Nacional*" de la FDA (*Food and Drug Administration*), o empresas como la BCS (Certificadora alemana) con sede en Ecuador, mediante un proceso que puede tardar entre dos y cinco años (AEBE, 2013; Pro Ecuador, 2013).

2.1.2.3. Productividad de banano orgánico en Ecuador

La demanda de bananos certificados ha venido creciendo, de tal modo que en la actualidad representa el 15,0% de las exportaciones (AEBE, 2013).

Se calcula que las exportaciones mundiales de banano orgánico certificado oscilan entre 13 000 y 14 000 toneladas, lo que representa más del 1,0% del total del comercio bananero. El mayor abastecedor de banano orgánico del mundo es República Dominicana, sus exportaciones alcanzan más de 60 000 toneladas y superan las exportaciones de banano convencional. El segundo productor en importancia de banano orgánico es Ecuador, donde la producción ha aumentado a un ritmo elevado. Perú exportó casi 19 000 toneladas. Otros abastecedores de banano orgánico son México, Colombia, Honduras, Guatemala y las Islas Canarias (España).

Las islas de Barlovento, Colombia, Costa Rica y Ghana también exportan banano de comercio justo (FAO, 2012).

La producción de banano orgánico en Ecuador se triplicó al pasar de 4 179 hectáreas cultivadas a 13 767 hectáreas. Las áreas cultivadas de la fruta en Ecuador aumentaron el 290,0%, debido al sistema de certificación de la fruta como alimento orgánico que se maneja, el cual se ha convertido en una condición de acceso a mercados extranjeros, 20 empresas y asociaciones productoras y exportadoras dominan el sector (AEBE, 2012; FAOSTAT, 2012).

Las importaciones de banano de comercio justo se iniciaron en 1996 y Europa occidental se ha mantenido como el principal mercado. Ecuador también exporta productos semi-elaborados de banano como puré de banano, harina de banano, banano deshidratado, hojuelas y chips de banano. Desde 1985 Ecuador ha exportado puré de banano. Este es elaborado con bananos *Cavendish* en óptima maduración (Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, 2011).

En Europa, en los últimos años se ha incrementado la presencia de productos orgánicos provenientes de Ecuador en los supermercados, y ha crecido considerablemente la demanda (FAOSTAT, 2012). De acuerdo con las certificadoras internacionales que mantienen agencias en el país, el banano orgánico es el producto estrella, la fruta ocupa el 60,0% de sus áreas certificadas (Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, 2011).

De acuerdo con un informe de 2006 de la Federación Internacional de Agricultura Orgánica (IFOAM, por sus siglas del inglés: *International Federation of Organic Agriculture*), Ecuador se ubica entre los 55 primeros países con mayor número de hectáreas con cultivo orgánico. En Sudamérica está entre los siete primeros.

La fruta producida es de alta calidad y se destina principalmente a los mercados de altos ingresos de América del Norte y Europa (70,0%) (AEBE, 2012; FAOSTAT, 2012). Se estima que cerca del 25,0% de los bananos de comercio justo son bananos orgánicos ecuatorianos certificados, y este porcentaje va en aumento (CORPEI, 2011).

Las perspectivas son favorables para la producción de banano en Ecuador, por la reciente apertura de una nueva terminal de carga por parte de Dole (Bananapuerto), y la mejora de las terminales en funcionamiento en Puerto Bolívar que aumentan la capacidad de exportación. Luego, la superficie plantada de banano destinada a la exportación aumentó a un ritmo anual del 2,6%, a pesar del descenso de los valores unitarios de exportación del 4,0% anual y podría seguir creciendo durante este decenio si la enfermedad fúngica Sigatoka negra pudiera combatirse de forma efectiva (FAO,

2010). La productividad laboral y la magnitud de las plantaciones en Ecuador son menores que en los países vecinos de América Latina exportadores de banano, lo que también indica que existe potencial para el aumento de la productividad derivado de las economías de escala.

2.1.3. Aporte del subsector bananero al desarrollo sostenible de Ecuador

El banano ecuatoriano es conocido a nivel mundial por su calidad y sabor, se cotiza en los mercados internacionales de Europa, Asia y América del Norte. Las características especiales de la fruta de Ecuador se debe a las excelentes condiciones de suelo y climatológicas, pues han permitido que pequeños, medianos y grandes productores desarrollen la explotación de banano, que permite abastecer la demanda mundial los 365 días del año (Pro Ecuador, 2013). La estructura productiva en el año 2013, mostraba que eran pequeños productores (menos de 30 ha), y poseían el 25,0% de la superficie cultivada (Tabla 2), pero de los mayores países productores de banano de Latinoamérica, Ecuador muestra un rendimiento productivo menor (37 TM/ha), comparadas con Colombia (51 TM/ha) y Costa Rica (41 TM/ha). El sector bananero ecuatoriano tiene unas características especiales que hacen que sea diferente, especialmente su área de sembrío y el número de productores (FAO, 2014).

Tabla 2. Estructura productiva del banano en Ecuador.

TIPO DE PRODUCTOR (ha)	PRODUCTORES (%)	SUPERFICIE (%)
Pequeño (0 a 30)	79	25
Mediano (30 a 100)	16	36
Grande (mayor a 100)	5	38

Fuente: Catastro del Banano 2013, MAGAP Elaborado por: Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, PRO ECUADOR

Desde el punto de vista de exportación el banano se cultiva con tecnología de punta y exhaustivo control de todos sus requerimientos. Los principales subproductos son: banano en almíbar y en rodajas deshidratadas (sin freír), banano congelado, banano deshidratado en hojuelas, banano pasa (higo), banano liofilizado, bebidas alcohólicas y etanol a partir de banano, harina y polvo de banano, jaleas, mermeladas, compotas y bocadillos de banano, jugos, néctares, y bebidas de banano, puré de banano, rodajas fritas de banano, sabor y aroma de banano, vinagre de banano y pulpa de banano (Pro Ecuador, 2013).

Entre otras utilidades que se le han dado al banano se encuentran la alimentación animal con los subproductos, y el aprovechamiento de las fibras obtenidas de la planta para utilizarlas en la industria textil. Asimismo los desechos fibrosos se utilizan como materia prima para la elaboración de pasta celulósica útil para producir papeles y

cartones. Adicionalmente, la fibra de la planta sirve como insumo para la fabricación de fibras industriales más resistentes a la degradación, y compite con la del vidrio y carbón (MAGAP, 2013).

En el año 2012 se registraron 7 millones de toneladas métricas de producción nacional de este sector, con ventas que van del 86,94% en el año 2010 a 94,13% en el año 2012 (Tabla 3), donde la provincia de los Ríos fue la principal productora, seguida del Oro y de Guayas (Catastro del Banano, 2013).

Tabla 3. Superficie, producción y ventas de banano (miles).

AÑO	SUPERFICIE (ha)		PRODUCCIÓN	VENTAS	VTAS/PROD
	PLANTADA	COSECHADA	TM	TM	%
2012	221,76	210,90	7 012,24	6 600,49	94,13
2011	200,11	191,10	7 427,78	6 850,16	92,22
2010	235,77	215,65	7 931,39	6 895,39	86,94

Fuente: INEC, (Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2012.

El monto en valor FOB en dólares de las exportaciones ecuatorianas de bananos o plátanos, frescos o secos (Partida 0803) hacia el mundo presentó un crecimiento del 9,79% en el periodo de 2007-2012 (Tabla 4).

No obstante, mantener el liderazgo en el comercio mundial de la fruta, constituye un reto de todos los años, para productores, exportadores y gobierno nacional, ya que tienen que enfrentar un mercado dinámico y altamente competitivo, en el cual únicamente la excelencia de la gestión de los protagonistas, en los procesos de producción y mercadeo, pueden, como lo vienen haciendo, conservar la primacía en el comercio internacional del banano.

Tabla 4. Exportaciones ecuatorianas de banano valores FOB en miles USD y peso en toneladas. Período 2007-2012.

Unidad de medida	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Acumulado 2007-2012	TCPA (%)
FOB	1302,732	1640,885	1995,950	2033,794	2247,508	2078,239	11299,08	9,79
Toneladas	5288,865	5360,486	5728,696	5165,475	5668,879	5196,065	32399,46	-0,35

Fuente: Banco Central del Ecuador (BCE), 2014. TCPA: Tasa de Crecimiento Promedio Anual

2.1.4 Enfermedades en *Musa spp.*

Las plagas son los factores más importantes y limitantes en la producción de plátano y banano en el mundo. Se puede afirmar que esta ha sido la motivación científica para la creación de programas de mejoramiento genético, así como también, del auge de las empresas de agroquímicos (FAO, 2012).

Entre las principales enfermedades que han afectado seriamente la industria dedicada a la producción y la exportación se encuentran: el Mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. var. *cubense* Schltdl., el BBTV (del inglés: *Banana Bunchy Top Virus*) y la enfermedad del Moko (*Ralstonia solanacearum* Smith) (Jain, 2002; Marín et al., 2003).

Los tres principales patógenos fúngicos de las manchas foliares del banano son *Mycosphaerella musicola* R. Leach ex J.L. Mulder, (Anamorfo: *Pseudocercospora musae* Zimm) que causa la enfermedad de Sigatoka amarilla, pero desde el siglo XX *M. musicola* fue reemplazada por *Mycosphaerella fijiensis* (Anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis*) que causa la enfermedad de la raya negra de la hoja (Sigatoka negra) y *Mycosphaerella emusae* (Anamorfo: *Pseudocercospora eumusae*) que causa la enfermedad de la mancha foliar eumusae (Jones 2000; Crous y Mourichon, 2002). Debido a la similitud de los síntomas causados por *M. musicola*, *M. fijiensis* y *M. eumusae*, se ha sugerido que las enfermedades causadas por estos tres hongos se denominen manchas foliares de Sigatoka (Jones, 2003).

La pudrición de raíces, cuyos patógenos responsables son: *Poria* sp., *Pythium* sp., *Armillaria mellea* Vahl y *Rhizoctonia solani* J.G.K., la putrefacción del rizoma (*Erwinia carotovora* Jones) y enfermedades virales (Enfermedad de mosaico, clorosis infecciosa, putrefacción de la vaina foliar) (Jones, 2003).

Otras enfermedades incluyen Podredumbre de la corona (*Ceratocystis paradoxa* De Seynes) Moreau, Pudrición del fruto (*Glomerella cingulata* Stonem) Spauld y Schrent, Punta de cigarro (*Verticillium theobromae*) (Turc) Mason y Hughes, Mancha Negra de hojas y frutos (*Deightonella torulosa*) (Syd) Ellis, Pudrición del Fruto (*Botryodiplodia theobromae* Pat) y Pecas de los frutos (*Pyricularia grisea*) Sacc (Agrios, 2005).

2.2. Sigatoka negra

2.2.1 Agente causal

El agente causal de la Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, con su estado imperfecto correspondiente a la especie *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, renombrado posteriormente como *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, es un hongo de la clase Ascomycetes, orden Dothideales, familia Dothideaceae (Marín et al., 2003; Agrios, 2005). Este hongo se reproduce y disemina a través de ascosporas y conidios los cuales constituyen el inóculo del patógeno (Meredith y Laurence, 1969; Marín et al., 2003).

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 pseudotecios o pseudoperitecios 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 un período de dos a cuatro semanas más que cuando se cortan (saneamiento), y se colocan en el suelo (Stover, 1988). Estas son las principales fuentes de inóculo de la enfermedad, pues las ascosporas diseminadas por el viento se depositan en las hojas más jóvenes, principalmente en la hoja cigarro y en las cuatro hojas más jóvenes (Burt *et al.*, 1998).

2.2.2. Daños económicos

La Sigatoka negra ha sido reconocida como la principal enfermedad foliar que afecta bananos y plátanos a nivel mundial, principalmente en plantaciones comerciales de América Central, Panamá, Colombia y Ecuador, así como en muchas regiones de Asia y África (Marín y Romero, 1992; Marín *et al.*, 2003). Además, es considerada como la más seria amenaza para la producción del cultivo de banano por sus efectos altamente destructivos sobre el follaje de las plantas y las graves consecuencias que esto tiene para la cantidad y calidad de la fruta (Guzmán *et al.*, 2013).

El patógeno ocasiona severos daños al follaje de la planta, disminución del área foliar y, por tanto su capacidad fotosintética y de respiración, con repercusiones directas sobre los rendimientos y si el ataque se origina sobre todo en las hojas jóvenes de la planta, la pérdida de la producción es total. También puede producir maduración prematura de los frutos, lo cual resulta en mermas importantes durante el transporte a los mercados de destino con menoscabo para los agroexportadores (Stover, 1972; Marín y Romero 1992; Suquilanda; 2001, Marín *et al.*, 2003).

Factores bióticos y abióticos están estrechamente relacionados en la epifitiología de *M. fijiensis* en la aparición de signos y síntomas. Alta temperatura, humedad

relativa y lluvias favorecen el desarrollo de la enfermedad, y su incremento en la severidad en las plantaciones. Corrientes de viento, especialmente durante períodos de tormentas, contribuyen en la propagación a largas distancias de las estructuras infectivas. Otras condiciones como alta densidad de siembra, fertilización inadecuada o impuntual, falta de canales de drenaje, retraso en labores culturales como deshoje, cirugías, nutrición y manejo de malezas se suman a las condiciones climáticas haciendo más difícil el manejo de la enfermedad (Burt *et al.*, 1998; Guzmán *et al.*, 2013).

El costo de control de esta enfermedad en países latinoamericanos supera los 10 millones de dólares, comparado con un ingreso anual de \$100 millones que generó la actividad bananera (FAOSTAT, 2012).

Las grandes extensiones de monocultivo en el banano de exportación, son del tipo Cavendish, y en ella el control de la enfermedad se realiza con aplicaciones aéreas de fungicidas. Aunque existen sistemas de pronóstico que ayudan a racionalizar el uso de agroquímicos, también existe pérdida de sensibilidad del patógeno hacia los fungicidas comerciales más comunes. Esto ha obligado a aumentar el número de aplicaciones en varios países de la América Latina y el Caribe, en muchos casos de 25 a 40 aplicaciones por año. El costo total del control de esta enfermedad en banano en Costa Rica se estimó en US\$1 250 000/hectárea/año (Guzmán y Romero, 2010). Este costo adicional a la producción es un problema hasta ahora manejable para los grandes productores que se dedican a la exportación del fruto, pero no para los pequeños cultivadores de banano en una agricultura de subsistencia quienes no pueden asumir el alto costo que esto representa (FAO, 2013).

En el período de 1985 a 2002, los problemas ambientales relacionados con la agricultura se convirtieron en una de las principales preocupaciones entre los investigadores, las autoridades y el público en general (FAOSTAT, 2012).

Entre los problemas que afectan al mercado mundial desde mediados del siglo XX, y que han influido en la forma de producción y comercialización del banano, se tienen: la pérdida de biodiversidad y sus efectos sobre la sostenibilidad, los efectos perjudiciales de la contaminación en la productividad, la pobreza, mala calidad de la superficie del agua y de las aguas subterráneas, así como las preocupaciones relativas a la salud en los trabajadores vinculados a las explotaciones; debido a la utilización inadecuada de productos químicos, los peligros de los transgénicos, y la demanda de los consumidores de «productos limpios» (FAOSTAT, 2012).

La importancia económica de la Sigatoka negra en Ecuador, radica en que su control constituye un rubro importante (20,0-25,0%) en la estructura de costos de producción del banano, el cual es cada vez más elevado, y genera así un clima de incertidumbre para los productores. A lo que se añade que para el sistema de producción orgánico no se cuenta con suficientes herramientas de este tipo. Por ello, la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) requiere una especial atención, debido a sus efectos negativos (Meredith y Lawrence, 1969; Marín *et al.*, 2003; Churchil, 2010; Pro Ecuador, 2013).

2.2.3 Historia y distribución de la Sigatoka negra

En Fiji la Sigatoka negra se descubrió como una enfermedad nueva en 1963 (Rhodes y Leach, 1964), aunque hubo evidencia de su presencia en Hawai y en algunas zonas del Pacífico desde mucho antes (Stover, 1972). En América Central se descubrió en Honduras en 1972 y desde allí se diseminó por el resto de la región (Haddad *et al.*, 1999). En Sudamérica, se reconoció en Colombia en 1981, posteriormente en Ecuador en 1989, luego en Cuba y Venezuela (Mourichon y Fullerton, 1990). En todos los países de América Central en 1980.

El origen y distribución de la Sigatoka negra, para los principales productores de banano en el mundo, cronológicamente fue: Honduras (1972), Belize (1975), Guatemala (1977), Nicaragua, El Salvador y Costa Rica (1979), México (1980), Panamá y Colombia (1981), Ecuador (1989), Venezuela (1991), Perú (1994), Bolivia (1996), Brasil, Estados Unidos (Florida) (1998), Bahamas (2004), Guyana Francesa (2008) (CIRAD, 2013).

En Ecuador se detectó por primera vez en la hacienda “El Timbre”, localizada en la provincia de Esmeraldas, aunque en la actualidad se ha extendido a la mayoría de las áreas bananeras que son aproximadamente 120 mil hectáreas, su presencia incluso se encuentra en pequeñas áreas cultivadas en Galápagos (AEBE, 2013).

2.2.4 Medidas de control

2.2.4.1 Control químico

El combate químico es la principal herramienta para el manejo de la Sigatoka negra. Se realiza mediante la aplicación alterna y en mezcla de fungicidas protectantes y sistémicos (Marín *et al.*, 2003; De Lapeyre de Belaire *et al.*, 2010). Se incluyen en este grupo el Mancozeb y el Clorotalonil y sistémicos como benzimidazoles, aminos, triazoles, estrobirulinas, anilino pirimidinas, carboxamidas y guanidinas. *M. fijiensis* ha desarrollado resistencia a los benzimidazoles, triazoles y estrobirulinas (Romero y

Sutton, 1997; Marín *et al.*, 2003) lo cual ha reducido su eficacia en campo y ha limitado su uso (Guzmán *et al.*, 2013).

El desarrollo de resistencia a los fungicidas de los grupos anteriormente mencionados, ha incrementado el uso de aminas y anilino pirimidinas, lo cual se vislumbra como un riesgo debido al aumento en la presión de selección que se ejerce sobre el patógeno y de fungicidas protectantes (Mancozeb y Clorotalonil) con el consiguiente aumento del riesgo ambiental y a la salud. Por lo anterior, el uso de los fungicidas sistémicos en banano debe ajustarse a las recomendaciones establecidas por el Comité de Acción Contra la Resistencia a Fungicidas (FRAC 2012, por sus siglas del inglés: *Fungicide Resistance Action Committee*, www.frac.info).

Por otra parte, existen problemas de resistencia cruzada entre los fungicidas que pertenecen a un mismo grupo, como es el caso de los benzimidazoles (Benomyl, Carbendazim y Metiltiofanato), triazoles y estrobilurinas (inhibidores Qo) (FRAC, 2013; Orozco-Santos *et al.*, 2013).

Los programas de control están en su mayor parte basados en los fungicidas protectantes como Mancozeb (usualmente aplicado en agua o en combinación con aceite) y Clorotalonil. El Mancozeb frecuentemente se aplica en combinación o en rotación con morfolina, con inhibidores de demetilación (IDMs), o con fungicidas estrobilurinas. El Clorotalonil se rota pero no se combina con otros fungicidas. La resistencia a los fungicidas benzimidazoles, IDM y estrobilurinas es muy común en muchas áreas de producción. Los fungicidas frecuentemente son aplicados mediante fumigaciones aéreas (Guzmán *et al.*, 2013).

Sin embargo, la contaminación ambiental causada por la utilización intensiva de sustancias químicas en la producción de monocultivos sigue siendo un desafío para el productor, ya que los cambios en la utilización de insumos afectan la productividad (Orozco-Santos *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 2013; Pérez, 2013).

2.2.4.2 Variedades resistentes

El uso de cultivares resistentes constituye en efecto el único medio práctico de controlar la Sigatoka negra para los productores porque los fungicidas en general son muy caros para ellos. Aunque existen cultivares resistentes de plátano y banano disponibles, estos muchas veces no son aceptados por las preferencias locales. Una prioridad importante de los centros internacionales de investigación es el desarrollo de cultivares resistentes aceptables. Sin embargo, obtener resistencia a enfermedades es especialmente complejo con el banano, ya que es difícil cambiar el manejo tradicional del cultivo y por otro lado, el mejoramiento genético de bananos y plátanos

depende del desarrollo de diploides con buenas características agronómicas y resistencia a enfermedades y que éstos puedan ser utilizados como líneas masculinas en cruzamientos con triploides fértiles, para la producción de híbridos. La esterilidad femenina y las características agronómicas indeseables de la presencia de genes diploides de resistencia para *M. fijiensis* ha sido la mayor preocupación para el rápido desarrollo de híbridos resistentes (Romero y Sutton, 1997).

La recombinación debido a la naturaleza heterotática de este patógeno, crea un alto potencial para que ocurran cambios genéticos dentro de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis*, lo que puede conducir a una rápida adaptación a las condiciones ambientales cambiantes y podría ser la razón de la elevada variabilidad patogénica detectada en el mismo (Orozco-Santos *et al.*, 2013).

2.2.4.3. Manejo cultural

Por manejo cultural se conoce la implementación o modificación de ciertas prácticas de cultivo con la finalidad de generar un ambiente menos favorable para la enfermedad o afectar la reproducción, diseminación e infección del patógeno (Agrios, 2005).

Las técnicas de manejo como el espaciamiento de plantas, drenaje de agua, aireación del suelo, remoción de malezas, eliminación de hojas o parte de ellas enfermas, quitar las hojas infectadas (deshojar) y ponerlas en el suelo y aplicar urea y otros productos puede acelerar la descomposición de éstas y así reducir más la fuente de inóculo (Andrews, 1990; Soto, 1993; Sutton y Peng, 1993). Con la integración de estas prácticas se estima una reducción del 50,0% del inóculo interno de la plantación (Orozco-Santos *et al.*, 2011).

2.2.4.4 Control biológico

El control biológico de enfermedades consiste en el uso de microorganismos o los productos de su metabolismo para controlar las poblaciones de un patógeno o para proteger directamente a las plantas de los patógenos en el sitio de infección antes o después de que esta ocurra (Agrios, 2005). Es realizado naturalmente o mediante la manipulación del ambiente, el hospedante, el antagonista o por introducción masiva de uno o más antagonistas (Cook y Baker, 1983; Falconí, 2014). Las estrategias del control biológico son las siguientes: el combate biológico del inóculo y la protección biológica de la superficie vegetal y el combate a través de la inducción de resistencia (Barrera *et al.*, 2006; Bettiol *et al.*, 2014).

Un concepto amplio de control biológico incluye a hongos, bacterias y virus, microfauna (insectos, ácaros, nemátodos), protozoarios (amebas), algas, plantas superiores (resistencia, residuos). Depende de la actividad de la comunidad de microorganismos e incluye a numerosas interacciones microbianas, existe en ecosistemas y agro ecosistemas con la influencia del hombre y las prácticas agrícolas sobre los controladores biológicos (Rivera *et al.*, 2014).

El control biológico está recibiendo mayor atención por el énfasis en la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola que tiende a reducir el uso de productos agroquímicos en dichos sistemas y las medidas regulatorias para disminuir la contaminación de alimentos con residuos de plaguicidas (Johnson, 1994; Guzmán *et al.*, 2013; Bettiol *et al.*, 2014).

Entre las limitaciones que encuentran los productos biológicos para su utilización a gran escala están su menor disponibilidad, eficacia y espectro de acción en comparación con los plaguicidas químicos (Andrews, 1992). El control biológico, debería estar orientado a aprovechar agentes o prácticas de control con diferentes mecanismos de acción, para dificultar la evolución de las plagas por la complejidad de los reguladores a los que se enfrentaría (Guzmán *et al.*, 2013).

El suelo es un reservorio natural de hongos, nemátodos, entomopatógenos, microorganismos fitopatógenos y antagonistas; se requiere detectar la presencia y diversidad de aislados nativos de éstos últimos, con el propósito de evaluarlos como agentes potenciales de control biológico. Además, las interacciones entre el hongo antagonista y los fitopatógenos en cada enfermedad son diferentes, por lo tanto es necesario conocer con certeza él o los mecanismos de acción involucrados, que permitan formular estrategias que redunden en una tecnología de manejo para reducir las aspersiones de los productos químicos y tratar de disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad (Colmenárez *et al.*, 2014).

Investigaciones dirigidas al desarrollo de métodos de control biológico para la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) han sido limitadas porque los controles químicos están ampliamente disponibles a los productores comerciales. Aunque los métodos de control biológico son deseables, principalmente para la protección del ambiente, su aplicación es escasa porque la Sigatoka negra es una enfermedad policíclica y el tejido susceptible del bananero está presente durante todo el año (Marín *et al.*, 2003; Churchil, 2010).

Se han obtenido aislamientos de bacterias antagonistas a *M. fijiensis*, formadoras de endósporas, del filoplanio de musáceas, algunos de los cuales (*Bacillus subtilis* y

Bacillus amyloliquefaciens) produjeron metabolitos que alteraron la estructura de la pared celular del micelio y las ascosporas e inhibieron fuertemente *in vitro* el desarrollo del patógeno (Ceballos *et al.*, 2012). También se han aislado y evaluado hongos del filoplanio de banano con propiedades quitinolíticas y se ha encontrado que algunos aislamientos son capaces de producir metabolitos secundarios con una alta actividad fungicida contra *M. fijiensis* en condiciones *in vitro* y en invernadero (*Trichoderma*), observándose un mejor desarrollo de las plantas y una menor severidad de la enfermedad cuando son tratadas con estos microorganismos (Carr, 2009; Cobos, 2010).

Otros investigadores han evaluado el uso de sustratos foliares como una estrategia para modificar el filoplanio del banano y promover el crecimiento y proliferación de microorganismos nativos (quitinolíticos y glucanolíticos) que compitan y antagonicen a *M. fijiensis*. Los resultados han sido interesantes en la reducción de ciclos de fungicidas necesarios para combatir la enfermedad (Patiño *et al.*, 2007).

Estudios futuros podrían contemplar la evaluación de microorganismos endofíticos, aislados de raíces, como pseudotallo e inclusive las hojas de musáceas, para inducir resistencia sistémica contra la Sigatoka negra. Hasta el momento no existen ejemplos de uso efectivo y eficiente del control biológico de la Sigatoka negra en condiciones de campo a gran escala, pero esto podría ser cuestión de tiempo en tanto se logren descubrir microorganismos o aislamientos con mayor capacidad como antagonistas (Guzmán *et al.*, 2013).

Por lo anterior, el uso de agentes de control biológico representa una alternativa viable de ser evaluada, particularmente aquellos descritos como efectivos contra enfermedades aéreas, los cuales podrían ser capaces de competir con el fitopatógeno antes de que penetre, ya sea por espacio y/o nutrientes y no le permita germinar, o bien afectarlo por la excreción de diversas sustancias antibióticas disminuyendo su crecimiento y potencial reproductivo. Entre ellos se pueden considerar a las especies del género *Trichoderma*, dadas sus características de ser eficaces en el control de fitopatógenos del suelo y foliares en algunos cultivos (Papavizas, 1985; Michereff *et al.*, 1995; Elad, 2000; Galleti *et al.*, 2008).

2.2.4.5 Manejo integrado

En 1991, Dent, definió al Manejo Integrado de Plagas (MIP) como un enfoque integral del control de plagas, que en el contexto socio-económico de los sistemas agrícolas, del ambiente que les rodea y de la dinámica de la población, de la especie de la plaga, emplea todas las técnicas y métodos apropiados de la manera más compatible posible

y mantiene a las poblaciones de las plagas por debajo de los niveles en los que podrían causar perjuicios económicos. En este sentido integra el concepto de MIP, la aspiración de desarrollo sostenible, por lo que este para ser utilizado debe ser: técnicamente aceptable, económicamente viable y socialmente deseable (Altieri, 2001; FAO, 2013).

El MIP es un enfoque ecológico porque toma en cuenta las relaciones que existen entre los diferentes componentes del ecosistema; en particular la interacción planta-patógeno (susceptibilidad, resistencia), con sus enemigos naturales (control biológico), con las condiciones físicas, mecánicas y agronómicas del medio (prácticas culturales) y en el caso de recurrir a plaguicidas, éstos deben ser lo más selectivos posible para reducir sus efectos nocivos sobre otros componentes del ecosistema (que provocan contaminación, residuos, intoxicaciones y destrucción del control biológico) (Suquilanda, 2001; Montealegre *et al.*, 2014).

Dentro del concepto anterior, para el manejo de la Sigatoka negra, se incluyen las prácticas fitosanitarias tendientes a la reducción de inóculo, el control de malas hierbas, el drenaje adecuado, la nutrición balanceada y la población y distribución de plantas. Con despunte y cirugía, a intervalos semanales, se logra reducir también la severidad de la enfermedad (Sigatoka negra) (Guzmán y Villalta, 2006). Otras prácticas adicionales también pueden ayudar en el manejo de la enfermedad, por ejemplo, el apilamiento o acordonamiento del tejido enfermo en el suelo y la aplicación de urea al 10,0% como inhibidor de la esporulación (Villalta *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2008; Martínez y Guzmán, 2010).

La alta virulencia de *M. fijiensis* enfoca las medidas preventivas hacia el manejo adecuado de labores culturales en la plantación y al monitoreo continuo de la evolución de la enfermedad, es así que se emplean parcelas pre aviso para establecer la mejor estrategia de manejo de fungicidas dentro de un programa anual de aplicaciones. El objetivo es mantener los niveles de la enfermedad en un umbral que no afecte la productividad (Orozco-Santos *et al.*, 2013).

La siembra en altitudes superiores a los 1000 metros sobre el nivel mar (msnm), o bajo condiciones de sombra moderada (bajo árboles), o la combinación con otras especies de plantas (siembras mixtas o huertos mixtos) ayuda a reducir la severidad del ataque de la Sigatoka negra. Los agentes de control biológico juegan un papel importante en la protección de cultivos, como parte de los esquemas de manejo integrado de plagas (Deacon y Berry, 1992).

Las técnicas tradicionales cada vez se vuelven más obsoletas dentro de un sistema donde la ciencia avanza a pasos agigantados. Lo anterior ha impulsado la búsqueda de alternativas para el manejo de enfermedades y plagas agrícolas, basados en el biocontrol con el empleo de bioproductos de origen microbiano, explorando el potencial presente en los metabolitos secundarios y en base a la biología molecular en aras de proponer nuevas soluciones para el manejo adecuado de los cultivos, un diagnóstico temprano de enfermedades y el mejoramiento genético de las plantas (MAGAP, 2011).

2.3. *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* constituye un número de especies de hongos saprofitos filamentosos, con capacidad para reducir daños en enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, debido, a su fuerte capacidad competitiva (Ahmad y Baker, 1987), al fenómeno de antibiosis (Nelson *et al.*, 1997), por la producción de enzimas líticas, metabolitos secundarios y al micoparasitismo. Muchas especies de este género son agentes de control biológico con potencial contra un sinnúmero de enfermedades (Martínez *et al.*, 2013). En particular, *Trichoderma harzianum* Rifai, es la especie con más amplio espectro de control, bajo diferentes condiciones ambientales (Weinding, 1932; Chet, 1987; Harman, 2006; Martínez *et al.*, 2013).

2.3.1 Estado sexual

Su fase perfecta (estado teleomorfo) lo ubica en la Clase Ascomycetes, Serie Pyrenomycetes, Orden Hipocreales, Género *Hypocrea*.

Hypocrea se caracteriza por poseer ascomas periteciales inmersos en estromas con alta variabilidad morfológica. Con ascosporas verdes o hialinas formadas en ascos típicamente cilíndricos de ápice romo a veces ligeramente engrosado con ocho ascosporas bicelulares mono o dimórficas, que se desarticulan en la madurez quedando 16 ascos esporados (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002; Barrera, 2012) y estado anamórfico *Trichoderma*.

2.3.2 Estado asexual

Su estructura de reproducción son conidios, y su estructura de resistencia, clamidosporas; éstas son similares a las de otros hongos formadores de clamidosporas, son de 5 a 10 veces más grandes que los conidios, por sus grandes reservas de lípidos (Rifai, 1969; Samuels *et al.*, 2012).

Los conidióforos miden de 62,5-69,0 x 3,0-4,7 μm , son de color verde, tienen ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas

laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en un ángulo amplio. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Las fiálides son largas y delgadas, con verticilos terminales de hasta cuatro fiálides. Ocasionalmente surgen solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con un tamaño de 6,3-15,6 x 2,7-3,4 μm . Los conidios tienen aproximadamente de 3,8-4 x 3,1-3,7 μm , con forma citriforme y subglobosos. Las clamidosporas intercalares, formadas por el micelio sumergido, subglobosas, de pared dentada, color verde suave y un tamaño de 12,5-10,0 μm (Bisset, 1991; Druzhinina et al., 2005).

2.3.3 Especies

El género *Trichoderma* contiene un número de especies de hongos saprofiticos, comúnmente establecidos en el suelo, sobre madera en descomposición y restos de plantas, los cuales pueden ser reconocidos en cultivos por sus características esporas de color verde. Aunque la identificación del género *Trichoderma* es relativamente fácil, la identificación de las especies no es simple. El género lo propuso Person en 1794 con cuatro especies, después Rifai (1969) dividió a *Trichoderma* en nueve especies y posteriormente Bisset (1984, 1991a, 1991b, 1991c) elevó algunas de las especies agregadas por Rifai a rango de secciones y las agrupó en *Trichoderma*, *Longibrachiatum*, *Pachybasium* y *Hypocreanum*. Se tienen alrededor de 100 especies descritas (Samuels et al., 2012).

Los conceptos de especies han sido revisados por Mayden (1997) quien los caracterizó como concepto morfológico de especies, el concepto biológico de especies, el concepto filogenético de especies y el concepto evolutivo de especies. El concepto evolutivo de especies es un concepto puramente teórico aunque los otros tres tratan de reconocer especies evolutivas. Posteriormente, propusieron que el acercamiento a una definición de especies en hongos se haga desde el concepto filogenético de especies mediante el análisis de numerosos locus polifórmicos. Es por ello que el proceso de identificación de las especies de *Hypocrea/Trichoderma* ha crecido considerablemente por el análisis de secuencias de distintos genes o secuencias neutras como por ejemplo ITS (del inglés: *Internal Transcribed Spacer*) (Kullnig-Gradinger et al., 2002; Druzhinina et al., 2010).

Para la identificación molecular de este género, se ha incrementado el número de marcadores genéticos como el factor de elongación de la transcripción (*tef1*) calmodulina (*cal*), actina (*act*), subunidad II de la RNA polimerasa (*rpb2*) (Samuels et al., 2009; Druzhinina et al., 2012).

Chaverri y Samuels (2003) describieron 40 especies de *Hypocrea/Trichoderma* con ascosporas verdes en todo el mundo, en una combinación de características fenotípicas y genotípicas, y concluyeron que las especies de ascosporas verdes no constituyen un grupo monofilético. En la página web del ISTH (*International Subcommittee on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy*) hay enlistadas 104 especies reconocidas de 2004 a 2008 y 153 secuencias de haplotipos de ITS 1 and 2 en el “TrichOKEY Barcode” (Samuels *et al.*, 2012).

Samuels (2006) en un estudio sobre Hypocreales del sudeste de Estados Unidos describió 32 especies de *Hypocrea/Trichoderma*. Posteriormente, Jaklitsch (2011) informó 56 especies de *Hypocrea/Trichoderma* con esporas hialinas comparando las secuencias *tef1* en un árbol filogenético con 135 especies, el cual sería el número de las especies conocidas en total.

Las identificaciones a especie en Sudamérica fueron hechas mediante la descripción de caracteres morfológicos y basándose en las claves de Rifai (1969) y Bissett (1991), mientras comprobaban el sistema de código de barras basado en secuencias de ITS-rDNA, utilizaron secuencias de cepas del estado anamórfico de suelos del Parque Nacional Iguazú (Druzhinina *et al.*, 2005), con este método identificaron: *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *Hypocrea jecorina* y *T. spirale*.

En una extensiva exploración realizada con aislamientos obtenidos de muestras de suelo de Colombia, México, Guatemala, Panamá, Ecuador, Perú y Brasil, fueron reconocidos 29 taxones basados en los análisis filogenéticos con secuencias de ITS-rDNA y *tef1* junto con la caracterización fenotípica de sus actividades metabólicas (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009).

Han sido varias las especies señaladas de *Trichoderma*, las cuales tienen variada distribución geográfica; las más importantes son: *T. hamatum* y *T. pseudokoningii* (condiciones de excesiva humedad), *T. viride* y *T. polysporum* (regiones de temperatura fría), *T. harzianum* (característica de temperaturas cálidas), *T. koningii* (ampliamente distribuida) (Rifai, 1969; Samuels, 2006; Jaklitsch, 2011).

A pesar de su importancia económica, la taxonomía del género es aún problemática y los estudios están basados principalmente en la morfología (Samuels, 2006), pero se intenta mejorarla utilizando acercamientos moleculares, incluyendo huellas y análisis de secuencia, pero es un campo de investigación aún novel.

2.3.4 Mecanismos de acción

El principal beneficio de *Trichoderma* para la agricultura, es el *antagonismo* contra microorganismos patógenos de las plantas, por su capacidad para producir secreciones enzimáticas tóxicas extracelulares que causan desintegración y muerte en hongos fitopatógenos que habitan el suelo (*micoparasitismo*), en la degradación de paredes celulares de las hifas de hongos patogénicos (*depredación*), en la producción de químicos volátiles y antibióticos antifúngicos que inhiben hongos basidiomicetos (*amensalismo*), en la colonización directa del hongo por penetración hifal (*predación*), en la *competencia* por oxígeno, nutrientes y espacio en el suelo y por su gran adaptabilidad y rápido crecimiento, sin ser estos mutuamente excluyentes por lo que mientras uno parece ser el principal, en realidad pueden actuar en conjunto (Martínez *et al.*, 2008).

La competencia se da principalmente por nutrientes y espacio, de ésta manera la causa más común de la muerte de un microorganismo es por inanición, puesto que requieren de nutrientes exógenos, como carbono, y hierro para germinar, penetrar e infectar el tejido, y si los sitios de infección están ocupados por el organismo benéfico el hongo fitopatógeno tendrá dificultades para prosperar (Hernández *et al.*, 2011).

La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo, a través de la producción metabólica de moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas hidrolíticas las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y β -1-3-glucanos, de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos y producen un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación. Mientras mayor sea la cantidad de productos metabólicos, el poder antagónico se incrementa (Kumar y Sharma, 2011). Sin establecer contacto físico alguno *Trichoderma* sp. puede inhibir el crecimiento de otros hongos mediante la producción de varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles como gliotoxina, viridina y gliovirina (Harman *et al.*, 2010).

Cuando un hongo parásito ataca directamente a un hongo patógeno es un micoparásito. Para que se lleve a cabo el micoparasitismo, el hongo antagonista produce exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante. El micoparasitismo involucra una secuencia de eventos, que incluyen la localización del blanco, a través de un crecimiento quimiotrópico, reconocimiento, ataque, lisis y adquisición de nutrientes. La producción de enzimas hidrolíticas y los factores que influyen en estos eventos están ligados entre sí (Harman, 2000; Harman, 2006).

Entre las enzimas hidrolíticas que producen especies de *Trichoderma* se encuentran las quitinasas, glucanasas, proteasas y celulasas. Dichas enzimas están relacionadas en el fenómeno de antibiosis y micoparasitismo al degradar la pared celular y así penetrar y micoparasitar al hospedante (Adebesin *et al.*, 2009). Las quitinasas y glucanasas son las enzimas más descritas en el control biológico de fitopatógenos (Akrami *et al.*, 2009).

2.3.5 Principales patógenos que controla

Evidencia científica ha demostrado que varios aislamientos de *Trichoderma* son eficientes en invernaderos, campo abierto, en suelo, la filósfera, y en almacenamientos fríos. Diferentes especies de *Trichoderma* tienen la capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia* sp., *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Fusarium oxysporum* fs. *dianthii* W.C. Snyder y H.N. Hansen, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), *Colletotrichum gloesporioides* Penz. y Sacc., *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Rosellinia bunodes* (Berk. y Broome) Sacc., *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (Rivas, 1994; Brandao *et al.*, 2002; Correa *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2008; Elmhirst *et al.*, 2011; Infante *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013).

En el control de enfermedades foliares *Trichoderma* spp. también ha demostrado ser efectivo ya que ha logrado reducir hasta un 75,0% a *Curvularia eragrostidis* (Henn.) Meyer, en ñame negro (*Dioscorea cayennensis* Lam.) (Michereff *et al.*, 1995) y disminuir un 84,0% el daño por *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Cremaschi *et al.*, 2011). Incluso se tienen cepas de *Trichoderma* spp. resistentes a los fungicidas comúnmente utilizados, entre ellos Benomyl, Metalaxil y Propiconazol. De esta forma, se pueden utilizar al mismo tiempo y de manera alterna en un control integrado de fitopatógenos tales como *Pythium ultimum* Trow., *B. cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary, entre otros (Elad, 2000; Quiroga *et al.*, 2006).

Uno de los agentes más estudiados de control biológico comercial es el aislado T39 de *Trichoderma harzianum* (Trichodex), el cual es considerado como un modelo al demostrar control biológico bajo condiciones comerciales en invernadero (Elad, 2000).

Por su parte, Borrás (1997) comprobó la efectividad de *Trichoderma* spp. como agente biocontrolador frente a la pudrición de la piña (*Ananas comosus* L.) causada por *Phytophthora parasitica* Dastur var. *nicotianae* en segmentos de tallos y observó un incremento sobre la brotación de las yemas en la secciones de tallos, así como una reducción de la incidencia de la enfermedad. Autores como García (2005), mostraron en condiciones de laboratorio la capacidad inhibitoria de los antagonistas *Aspergillus*

spp. y *Trichoderma* spp. frente al hongo patógeno *Macrophomina phaseolina* Tassi, aislado de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.), los cuales detuvieron la producción de esclerocios, *Trichoderma* limitó el crecimiento de *Macrophomina* en un 30,0%.

Los estudios relacionados con el empleo de *Trichoderma* spp. como biocontrolador de enfermedades foliares no han sido muy difundidos, no obstante investigadores como Pérez y Echemendia (1994) señalaron que bajo condiciones de infección natural de *Alternaria porri* [Ellis] Cif. obtuvieron una disminución de su incidencia en un 20,0% del hongo patógeno con la aplicación foliar de *Trichoderma harzianum* en plantas de cebolla (*Allium cepa* L.).

También investigadores como Arzate-Vega *et al.* (2006), evaluaron el efecto antagónico *in vitro* y en invernadero de cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, concluyendo que los menores porcentajes ponderados de infección se obtuvieron en los tratamientos biológicos a base de *Trichoderma*, dando como resultado un mejor control de la enfermedad, por ello sugirieron evaluarlas bajo condiciones de campo.

También en Costa Rica se han alternado y combinado dosis de *Trichoderma* con microorganismos eficientes para el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y concluyeron que se requería estudios futuros orientados a evaluar el efecto de dosis crecientes de microorganismos y *Trichoderma* sp. y su posible combinación con aceites minerales, ceras y aceites vegetales y otras sustancias que ayudaren a aumentar su actividad (Villalta y Guzmán, 2008).

En Ecuador, las investigaciones se encuentran en sus etapas iniciales por parte de algunas instituciones gubernamentales y universidades públicas, considerando que el potencial de utilización de *Trichoderma* y otros biocontroladores puede ser una alternativa para la solución a los problemas fitosanitarios de los cultivos destinados a la exportación como el banano, café, cacao, ornamentales y frutales, por el cambio de la matriz productiva formulada por el ejecutivo, donde se aplica la política nacional del “Buen Vivir”, que tiene como eje transversal un componente de investigación sobre Agricultura Orgánica y Bioplaguicidas, y manifiesta que: “El control biológico por microorganismos presenta ventajas como: especificidad, permanencia en el tiempo e inocuidad para el ser humano y el medio ambiente, ya que se realiza con organismos presentes naturalmente en los ecosistemas del país” (Pro Ecuador, 2013; Falconí, 2014).

2.3.6. Bioproductos a base de *Trichoderma* spp.

Mundialmente se producen y aplican cientos de productos de origen biológico para el control fitosanitario, de éstos la mayoría son a partir de bacterias, principalmente *Bacillus thuringiensis* Berliner, y de diferentes especies de insectos, pero sólo unas decenas de productos se obtienen a partir de hongos, nemátodos, protozoos o virus (Fernández, 2006; Pesántez, 2010).

A pesar de que se conocen más de 700 especies de hongos capaces de actuar como controladores de plagas y enfermedades que afectan a diferentes cultivos, solo unos pocos se han logrado producir y aplicar de forma estable y masiva por el poco desarrollo tecnológico de los métodos de reproducción a escala industrial, y es precisamente el poder superar estas limitaciones lo que puede hacer posible su empleo (Falconí, 2014).

Para la reproducción masiva de las cepas promisorias de *Trichoderma* sp. se utilizan métodos artesanales (sólido, líquido estático y bifásico). Se emplean sub-productos agrícolas y como soporte sólido se usan materiales celulósicos atendiendo a la alta capacidad celulolítica de estas especies (Pesántez, 2010; García *et al.*, 2013). Los métodos alternativos se emplean teniendo en cuenta la forma de aplicación y el mecanismo de acción que ejerce la cepa en el control de los patógenos (Djonovié *et al.*, 2006; Pesántez, 2010).

Para la selección del método de reproducción es importante tener en cuenta no sólo la factibilidad tecnológica y económica, sino el mecanismo de acción ya que en el producto final deben estar presentes las estructuras infectivas y los metabolitos activos de forma estable y con su mayor potencial biológico (Fernández, 2006). Además, si su efecto se encuentra estrechamente vinculado a condiciones locales y microambientales y muy específicamente a condiciones de humedad y temperatura entre otros factores condicionantes (Falconí, 2014).

La producción se acompaña por un reglamento de control de calidad que incluye verificación de la pureza y la efectividad biológica de cada una de las etapas del proceso y al producto final, el cual está constituido por la biomasa del hongo, metabolitos y residuos del medio de cultivo. Si se recobra sobre un soporte adecuado su almacenamiento se puede prolongar a 3-4 meses a temperatura ambiente. Estas producciones se realizan en biolaboratorios mediante un proceso semi-industrial lo cual requiere de un personal bien adiestrado (Fernández, 2006; Pesántez, 2010; García *et al.*, 2013).

Los aspectos a tener en cuenta son: selección de la cepa adecuada, selección de un medio de cultivo con un balance de nutrientes que permita obtener un desarrollo del hongo con el máximo potencial patogénico y con eficiencia económica, la posibilidad tecnológica y económica de escalar el proceso a nivel de producción, formulación que permita períodos de almacenamiento prolongados, facilidad de aplicación y estabilidad en condiciones de campo (Andrews, 1992; Stefanova *et al.*, 1999, García *et al.*, 2013).

2.3.6.1. Control de calidad en la producción de bioproductos

La calidad se define como el conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que lo hacen apto para satisfacer las necesidades a las cuales va dirigida. Las normas y procedimientos para el control de calidad de los productos y procesos conjuntamente con los registros, constituyen la garantía para la validación de las producciones de bioplaguicidas. Un producto con especificaciones bien definidas y con los consiguientes procedimientos de control de calidad asegura su buen funcionamiento y su seguridad, promueve la estandarización de los costos de producción y garantiza su estabilidad en el mercado, lo que conlleva a la ganancia de confianza en el consumidor. En el caso de los productos a base de hongos su funcionamiento no confiable por falta de calidad ha limitado su éxito en países en desarrollo donde estos requerimientos son mínimos o no existen (Elósegui, 2006; Fernández *et al.*, 2006).

Puntos críticos de control de calidad

Fernández *et al.* (2006) han sugerido que el primer punto donde se controle la calidad sea en el subcultivo de la cepa del hongo del cual se parte. Esto incluye los subcultivos de trabajo y los de conservación. En ambos casos se tienen que establecer métodos de conservación y mantenimiento que garanticen la estabilidad genética y fenotípica de las cepas que deben ser verificables a través de pruebas bioquímicas y moleculares. Se debe verificar la pureza del cultivo y la actividad biológica con la frecuencia necesaria.

Continúa apuntando que en la preparación de inóculos se debe tener en cuenta su concentración y pureza. Todos los medios de cultivo deben ser verificados para su esterilidad segura antes y después de la inoculación. En la etapa de post-cosecha, previo envasado, se precisan métodos para extraer y/o formular los propágulos (conidios generalmente).

Con respecto al monitoreo de la contaminación del proceso se sabe que todas las producciones microbianas tienen el riesgo de contaminarse y en las artesanales esto puede ocurrir con más frecuencia si no se cumplen las buenas prácticas de producción

debido al gran número de operaciones manuales. Por ello, se deben registrar todos los pasos críticos del sistema de producción y el resultado de los análisis de contaminantes para identificar la fuente y tomar medidas preventivas. Esto incluye el subcultivo del que se parta para preparar los pre-inóculos, los inóculos, el sustrato antes y después de esterilizado y el producto final (Elósegui, 2006).

Las especificaciones para el nivel permisible de contaminantes en el producto final dependerán de los métodos de producción y el procesamiento del producto en la cosecha, post-cosecha y la formulación, etapas últimas que se realizan en ambientes no estériles. Por tanto se debe establecer un nivel base de entrada de contaminantes a través de un estudio bien controlado, chequeando los controles en las primeras etapas del proceso para demostrar que el nivel de contaminantes del producto final es debido inevitablemente a las últimas fases.

Buenas Prácticas de Producción

Las buenas prácticas de producción (BPP) son una herramienta básica para la obtención de productos seguros que se centralizan en la higiene y forma de manipulación. Los elementos más importantes son el cumplimiento de las técnicas y prácticas en instalaciones adecuadas (Astiz *et al.*, 2010).

Comercialización

A nivel mundial se puede encontrar una variedad de empresas que se dedican a la producción y comercialización de productos biológicos, formulados a base de hongos y bacterias tales como *Azotobacter vinelandii* DJ y *Trichoderma*. Una de estas empresas es IAB, S. L. (Investigaciones y Aplicaciones Biotecnológicas, S.L, España), también CANNA ESPAÑA es reconocida en el mundo como líder en tecnología para plantas, y los productos de la misma se encuentran a disposición de toda Europa, Australia, Norte América, Oriente Medio y África (Falconí, 2014).

En Latinoamérica, ORIUS BIOTECNOLOGÍA de Colombia y uno de sus productos TRICHOD, es formulado con esporas en latencia del hongo *Trichoderma harzianum*. Otra empresa colombiana es SOLUCIONES ORGÁNICAS que ofertan TRICHOBIO, BASSIANIL, LILACINOL, METABIOL, VERTLEC. Cuba posee laboratorios que reproducen microorganismos (hongos y bacterias) para controlar algunas plagas y enfermedades, así se trabaja con *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* Sorokin, *Bacillus thuringiensis* Berliner, *Trichoderma* sp., *Azospirillum* sp. y *Lactobacillus* sp. (Fernández *et al.*, 2006).

En Venezuela resalta AGROBICA C.A. la cual ha desarrollado un fungicida biológico, TRICOBIOIL. A nivel de Ecuador, Chimborazo, se tiene MIKROBEN, del Departamento de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. MIKROBEN, actualmente cuenta con 19 años de investigación a nivel de laboratorio y campo, este proceso permite poner a disposición de los agricultores de la región: Sierra, Costa y Oriente, productos biológicos (Falconí, 2014).

A pesar de las numerosas investigaciones sobre el tema, pocos métodos de control biológico han llegado a comercializarse. Para que un producto sea comercializado debe existir demanda de los productores y otros especialistas en la cadena de distribución comercial; ser técnica y económicamente asequibles y atractivos competitivamente en relación con otros controles, ser aceptable por los grupos ecologistas y los encargados de las normativas legales y también ser al menos tan eficaces como los demás tipos de controles, dignos de confianza en cuanto a los rendimientos así como persistentes en su actividad. Para su utilización práctica deben ser compatibles con las tecnologías existentes y capaces de ser conservados durante largos períodos de tiempo en exigencias especiales (Guzmán *et al.*, 2013).

La investigación sobre Sigatoka negra debe enfocarse hacia líneas prioritarias que conduzcan a un manejo sustentable de la enfermedad, con el propósito de reducir la dependencia del combate químico, y de ese modo disminuir la contaminación ambiental y los riesgos a la salud humana y al ambiente, inherentes al uso del mismo. Es necesario aunar esfuerzos internacionales y continuar con la investigación en manejo integrado, fortalecer y optimizar cada vez más el combate cultural; además, de incentivar y apoyar la investigación en combate biológico.

Asimismo, es de vital importancia realizar estudios específicos de productos biológicos de especies de hongos que pertenecen al género *Trichoderma* que han sido plenamente caracterizadas para tener aplicación en el ámbito agrícola y sin embargo son muy poco aplicadas en condiciones de campo sobre todo para la Sigatoka negra. Debido en gran parte a la propia naturaleza compleja del patógeno y a las características del hospedante (plantaciones extensas genéticamente uniformes y tejido susceptible disponible durante todo el año), lo cual ha permitido una estrecha relación entre éste y el patógeno. Adicionalmente estos formulados no tienen el mismo efecto en todas las regiones agrícolas debido a las diversas condiciones ambientales que existen en la naturaleza, las cuales pueden aumentar o disminuir su efectividad; así mismo ninguno es utilizado contra Sigatoka negra. Por esta razón, se vislumbra como alternativa al uso de estos hongos en bananeras orgánicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Sanidad Vegetal, Sección Fitopatología, de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo del Ecuador. Los experimentos de campo se llevaron a cabo en la Finca bananera del Grupo Agrícola Prieto, la cual se ubica en la Provincia de El Oro, cantón Pasaje, una de las tres zonas del país destacadas por la producción de banano.

Material vegetal

Para los experimentos en casa de cultivo se utilizaron plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA), susceptible a la Sigatoka negra. Estas fueron obtenidas por cultivo *in vitro* en el Centro Internacional Biotecnológico del Ecuador (CIBE), vía organogénesis, las cuales tenían una altura de 30 cm y tres hojas activas.

En los experimentos de campo se emplearon hijos de plantas de banano del mismo cultivar procedentes de una plantación comercial. Estos fueron seleccionados, desinfectados y colocados en fundas de polietileno con suelo, y cuando desarrollaron de tres a cuatro hojas fueron plantadas en el lugar definitivo.

Microorganismos

Se emplearon 100 cepas de *Trichoderma* spp. pertenecientes a la Colección de Cultivos microbianos del Laboratorio de Sanidad Vegetal, sección Fitopatología de la ESPOCH (Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Estas habían sido aisladas de diferentes localidades de las provincias de Chimborazo, El Oro, Los Ríos, Esmeraldas y Guayas (Figura 1, Tabla 5) (Anexo 1). La identificación de las cepas hasta género se realizó en el propio laboratorio en base a sus caracteres culturales y morfológicos (Bissett, 1984; Samuels *et al.*, 2012). El número de cepas por provincia y localidad se resume en la tabla 5. Para todos los experimentos, de cada cepa en estudio, se obtuvieron cultivos monospóricos y en aquellos que se refieren a valores de tasa de crecimiento ésta se calculó según la fórmula: $\text{tasa de crecimiento} = (\text{crecimiento final} - \text{crecimiento inicial}) / \text{tiempo de incubación}$ (Guijón-López *et al.*, 2010) y se expresó en mm día^{-1} .

También se utilizó la cepa de *Mycosphaerella fijiensis* CCCh-Mf1, de la Colección de Cultivos microbianos del Laboratorio de Sanidad Vegetal, sección Fitopatología, de la ESPOCH. Esta cepa, altamente patogénica, fue aislada de la región Costa de Ecuador, de una bananera orgánica donde no se aplican productos químicos para el control de Sigatoka negra. Se cultivó en medio de cultivo Agar Papa y Dextrosa (PDA), Caldo Papa y Dextrosa (PDB) (Figura 2) y en los ensayos donde se utilizaron suspensiones miceliales estas se prepararon acorde con lo descrito por Leiva-Mora *et al.* (2010).

Tabla 5. Origen de las cepas de *Trichoderma* empleadas en el estudio.

No.	Provincia	Región	Localidades	No. Cepas
1	Chimborazo	Sierra	3	67
2	El Oro	Costa	28	29
3	Esmeralda	Costa	1	2
4	Guayas	Costa	1	1
5	Los Ríos	Costa	1	1
Total			34	100

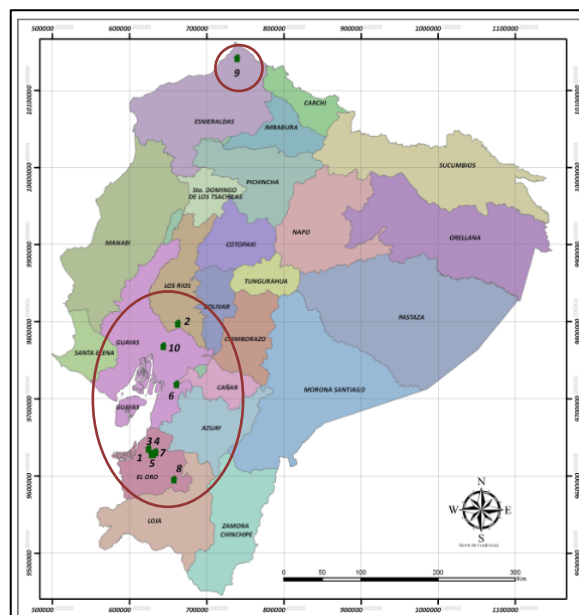


Figura 1. Ubicación de los sitios de aislamiento de cepas de *Trichoderma*.



Figura 2. Cepa de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet CCCh-Mf1. a. Colonia crecida en medio de cultivo Agar Papa y Dextrosa, b. Crecimiento en medio de cultivo Caldo Papa y Dextrosa (PDB) a los 7 días de incubación a 28 °C, c. Crecimiento en medio de cultivo PDB a los 15 días de incubación.

Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los datos de las variables evaluadas se realizó con el paquete estadístico *Statistic Package for Social Science* (SPSS) versión 21.0 para Windows. En todos los casos se comprobaron los supuestos de normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas por la prueba de Bartlett. Cuando

los datos no cumplieron con los supuestos se empleó la prueba de Kruskal Wallis. Las diferencias entre los tratamientos fueron separadas mediante la prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

3.1 Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp.

3.1.1 Crecimiento radial

Con el objetivo de comparar el crecimiento *in vitro* de 100 cepas de *Trichoderma* se inoculó un disco de micelio de 0,2 cm de cada cepa en placas de Petri de 90,0 mm de diámetro con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (HIDEM). Las placas se incubaron a 27 ± 1 °C y luz continua incandescente de 40W. Cada 24 h y hasta las 120 h se midió el crecimiento radial de las colonias (mm). De cada cepa se emplearon tres placas y el experimento se repitió dos veces.

Los datos se sometieron a un análisis de conglomerados por el método de Ward, el coeficiente de distancia empleado fue la distancia euclídeana promedio y las cepas se agruparon según su crecimiento radial. Se seleccionaron diez cepas ubicadas entre las de mayor crecimiento radial en el menor tiempo de incubación y que se hubieran aislado de plantaciones bananeras.

3.1.2 Antagonismo *in vitro* frente a *M. fijiensis*

Se emplearon las diez cepas de *Trichoderma* seleccionadas en el acápite anterior y la cepa de *M. fijiensis* CCECh-Mf1. Ambos microorganismos se enfrentaron mediante cultivo dual en placas de Petri de 90,0mm de diámetro con medio de cultivo PDA. Se colocó en un extremo de la placa un disco de 7,0mm de diámetro de micelio del patógeno (tomado del crecimiento en placa de Petri inoculada con suspensión micelial en medio de cultivo PDA) y en el extremo opuesto otro disco de 7,0mm con micelio del antagonista con 50,0mm de separación entre ellos. Los cultivos se incubaron a 27 ± 1 °C y oscuridad, y cada 24 horas se midió el crecimiento radial del micelio de los hongos hasta los siete días de incubación.

La capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp. se evaluó según Bell *et al.* (1982) (Tabla 6), y las formas e intensidad del antagonismo por los criterios propuestos por Davet *et al.* (1981). Como formas de antagonismo se consideraron: el antagonismo físico donde las hifas de los dos hongos forman un relieve en la zona de contacto, antagonismo químico en el cual las hifas dan origen al fenómeno de lisis en la zona de contacto, antagonismo por micoparasitismo que implica que las hifas del antagonista recubren las del parásito entrelazando o entrecruzándose con estos y ocupando el espacio vital, y antagonismo físico-químico donde las hifas de los dos hongos no alcanzan a tomar contacto, dando origen a un espacio vacío. La intensidad del

antagonismo se catalogó como: elevada (evidente, el patógeno es inhibido en el crecimiento más del 25,0%), intermedia (el patógeno es inhibido en el crecimiento menos del 25,0%) o escasa (el patógeno no es inhibido en el crecimiento por el antagonista).

Tabla 6. Escala empleada para evaluar el antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. contra *M. fijiensis* a partir de lo referido por Bell *et al.* (1982).

Grado	Capacidad antagónica
1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo.
2	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo y ningún organismo parece dominar al otro.
4	El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y parece resistir a la invasión por <i>Trichoderma</i> .
5	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio de cultivo.

Además, se determinó el tipo de interacción entre las hifas (enrollamiento, penetración, vacuolización o lisis) mediante microcultivos (Riddel, 1950) donde se inocularon el patógeno y el antagonista de conjunto. Para las observaciones se utilizó un microscopio *Swif Optical Instrument* modelo M10, el aumento utilizado fue de 400x.

3.1.3 Identificación

Las cepas seleccionadas en el acápite anterior se caracterizaron morfológica, cultural y molecularmente y se identificaron a partir del análisis integral de los resultados.

Caracterización morfológica y cultural

Para la caracterización de las cepas según sus caracteres morfológicos se tomaron en cuenta los criterios establecidos por Bissett (1984), Bissett (1991), Samuels *et al.* (2006) y Samuels *et al.* (2012). Específicamente, se observaron las características de los conidios, conidióforos, fiálides, clamidosporas y del crecimiento de las colonias. Para ello se inoculó un disco de micelio de 0,2 cm de diámetro tomado del borde de una colonia crecida en medio de cultivo PDA durante 48 h y luz continua proporcionada por una lámpara incandescente de 40 W.

Las placas se incubaron en iguales condiciones durante 72 h y al cabo de ese tiempo se describieron los caracteres culturales de las colonias y se realizaron preparaciones microscópicas para observar las estructuras de reproducción. Adicionalmente se emplearon microcultivos (Riddel, 1950) con el mismo fin. Se realizaron mediciones a 30 conidios por cepa con micrómetro ocular.

Caracterización molecular

La caracterización molecular de las cepas se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología molecular del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador a partir del análisis de las secuencias de la región del espaciador interno del transcrito (ITS, del inglés: *internal transcribed spacer*) del ADNr (ITS1–5.8S rDNA–ITS2).

- Producción de micelio

A partir de cultivos crecidos en placa con PDA durante cinco días a 27 ± 1 °C se tomaron discos de micelio de 10,0 mm de diámetro del borde de las colonias, que se inocularon en Erlenmeyer de 250,0 mL de capacidad con 100,0 mL de medio de cultivo Caldo Papa y Dextrosa (PDB) (Fluka) a razón de dos discos por cada uno. Posteriormente, se incubaron en condiciones estáticas a 28,0°C y oscuridad durante 72,0 h. Al cabo de ese tiempo el micelio se separó por filtración, se eliminó el exceso de humedad con papel de filtro y se conservó en papel de aluminio a -20,0°C hasta la extracción del ADN.

- Extracción y cuantificación de ADN

Se realizó la extracción de ADN de las muestras fúngicas mediante el protocolo descrito por Plaza *et al.* (2004), con modificaciones, el cual se describe a continuación. Para obtener el ADN se recolectaron de 200,0 a 400,0 mg de micelio fresco del hongo en microtubos de 2,0 mL, la muestra se resuspendió en 500,0 µL de tampón de extracción (0,1 M NaCl; 0,5 M Tris- HCl pH 8,0; 5,0% de SDS) y se maceró con ayuda de arena de cuarzo por 10 minutos, se centrifugó a 13 000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Al precipitado (*pellet*) formado, se le adicionaron nuevamente 500,0 µL de tampón de extracción y el proceso de maceración y centrifugación se repitió. Al sobrenadante recuperado se le agregó igual volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vórtex vigorosamente; se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos y cuidadosamente se tomó la fase acuosa en un nuevo tubo. Se agregó igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló, se centrifugó durante 5 min a 13 000 rpm. Se colocó la fase acuosa en un nuevo tubo, para la precipitación del ADN se añadieron 600 µL de isopropanol (-20,0°C), se mezcló por inmersión y se almacenó en hielo por una hora.

Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 10,0 min. El *pellet* de ADN fue lavado dos veces con etanol al 70,0% y secado a 37,0°C durante 20 min para finalmente ser resuspendido en 50,0 µL de tampón TE (0,1M; pH8). Para determinar la concentración de ADN se utilizó el espectrofotómetro Epoch®, empleando el software Gen5 2.0.

- Amplificación de cebadores ITS1/ITS4

Para la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 fueron usados los cebadores: ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990). Se empleó un Termociclador (*Thermal cycler API Biosystems*). La mezcla de reacción del PCR en un volumen final de 25,0 µL contenía: 2,5 µL de solución tampón 0,5X 1,5 µL de MgCl₂ 1,5 mM; 1,0 µL de dNTPs 0,1 mM; 0,5 µL de Taq polimerasa 0,1U/ µL; 1,0 µL de ADN genómico total 20 ng/ µL y 2,0 µL de cada cebador 0,4 µM.

El programa de amplificación que se utilizó consistió en un ciclo de 5 min a 95,0 °C, 35 ciclos de 1 min a 94,0 °C, 2 min a 55 °C y 1 min a 72,0 °C, la extensión final fue de 10 min a 72 °C y se conservó 4,0 °C. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2,0%. Las muestras se prepararon mezclando 1,0 µL de azul de parada (*Blue Stop*) con 4,0 µL de la muestra amplificada y se cargó en cada pocillo del gel 5,0 µL de esta mezcla. Se incluyó un marcador molecular de talla (*Track-it 100 bp DNA Ladder INVITROGEN®*). La migración se efectuó a 100,0 V durante 35 minutos. Transcurrido el tiempo, se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio de 15,0 ppm durante un período de 30 minutos y se visualizaron los productos amplificados en el fotodocumentador con luz UV. Se incluyó un control positivo de la reacción de amplificación.

- Secuenciación

Para el proceso de secuenciación fue necesario hacer réplicas de la amplificación, así se realizaron cuatro repeticiones por cada muestra, con el objeto de contar con suficiente concentración del amplicón, considerado que este tuvo que ser purificado. Para este procedimiento se empleó el kit de purificación de producto PCR *PureLink® PCR Purification Kit - Life Technologies* (no. cat K3100-01) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Con el producto PCR purificado se realizó la reacción de secuencia con el Kit de secuenciación *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, siguiendo las especificaciones del fabricante para un volumen de 10,0 uL de reacción y para la purificación el método de precipitación con EDTA/Etanol. La secuenciación de las muestras se realizó en el ABI PRISM 310 y fueron analizadas con el software *Sequencing Analysis 5.3.1*.

Las secuencias nucleotídicas se compararon con las existentes en la base de datos *Genbank del National Center for Biotechnology Information* (NCBI, TrichOkey 2 (<http://www.isth.info/tools/molkey/index.php>)).

A partir de los resultados de los acápites 3.1.2 y 3.1.3 se seleccionó una cepa con la cual se continuaron los estudios para el desarrollo del bioproducto.

3.2 Formulación de bioproducto

Con el objetivo de formular un bioproducto con potencial para el uso en el manejo de la Sigatoka negra se realizaron los ensayos que se describen a continuación.

3.2.1 Proceso fermentativo

Se comparó la producción de conidios de la cepa seleccionada en el acápite 3.1.3 en cultivo artesanal en frascos de vidrio y en el biorreactor para obtener una formulación de polvo seco.

Se utilizó un sistema de fermentación sólido. Las condiciones de incubación, contenido de humedad del sustrato y los dos sustratos utilizados (cascarilla de arroz y arroz partido) fueron definidos en experimentos previos. Todas las materias primas se obtuvieron de proveedores locales. El inóculo inicial de *Trichoderma* se preparó a partir de colonias crecidas en placas de Petri con medio de cultivo PDA, durante 48h a 27 ± 1 °C. Se adicionó Tween 80% más agua destilada estéril a las placas y se colectaron los conidios. La concentración de la suspensión conidial se ajustó a $\sim 2,5 \times 10^9$ conidios mL⁻¹.

Cultivo artesanal en frascos de vidrio

La cascarilla de arroz se colocó en un recipiente de 5,0 L de capacidad y se mezcló con agua corriente y melaza al 1,0%. Después de 24h en remojo se decantó el líquido. El arroz partido se lavó dos veces y se escurrió. Posteriormente, se mezclaron en proporción de 3:1 y este soporte se distribuyó a razón de 200,0 g en frascos de vidrio de 750,0 mL de capacidad que se sellaron con papel Kraft y se esterilizaron en autoclave a 121,0°C y 1,0 atm de presión por una hora.

Una vez que el sustrato estuvo estéril los frascos se agitaron vigorosamente para evitar la formación de grumos, se adicionaron 6,0 mL del inóculo de la cepa de *Trichoderma* seleccionada en el acápite 3.1.3 para una concentración final de $\sim 1,0-2,5 \times 10^6$ conidios g⁻¹ ($6,0-6,4 \log_{10}$ conidios g⁻¹). Se agitaron los frascos, se sellaron con papel Kraft y se colocaron en la cámara de incubación por 21 días a 27 ± 1 °C y luz continua mediante bombillas incandescentes de 40 W (Figura 3a).

Después del período de incubación el contenido de cada frasco se colocó individualmente sobre bandejas previamente desinfectadas con alcohol al 70,0% (v/v) y se sometió a secado en estufa a 40,0°C durante 24 horas. En este tratamiento se emplearon 40 frascos.

Cultivo en biorreactor

Se empleó un biorreactor diseñado en la ESPOCH (Jiménez y Pantoja, 2012) de forma cilíndrica de acero inoxidable, con una camisa externa, calentado con niquelinas, con controlador de temperatura, lectores de humedad y pH, un sistema abatible y capacidad de 8,60 kg de sustrato sólido. La altura nominal es de 35,0 cm, diámetro 35,0 cm, potencia del motor de agitación de 1/2 Hp y un caudal de aireación de 62,4 Lmin⁻¹, con un agitador de paletas tipo palas planas con una altura de 27,5 cm, longitud del brazo 33,4 cm, diámetro del rodete 1,9 cm, alto de la paleta 2,8 cm y un ángulo de incidencia de 45°. Este equipo utiliza un compresor de aire con un filtro y cuenta con iluminación continua mediante bombilla incandescente de 40W (Figura 3b y c).

El sustrato se preparó de forma similar a la descrita para el cultivo en frascos de vidrio. Se dejó enfriar después de la esterilización y se colocaron 8,5 kg en el biorreactor. Se agregaron 250,0 mL del inóculo de *Trichoderma*. Mientras se inoculaba se agitó el sustrato para dispersar el inóculo. Se realizó una aireación de cuatro horas diarias, la temperatura se mantuvo en 27 ± 1 °C y luz continua. Al final del periodo de incubación (21 días) se colectó el contenido del biorreactor y se secó igual que en el caso de los frascos.



Figura 3. A. Frascos de cultivo B. Biorreactor empleado para el proceso fermentativo y C. Preparación de bioproducto elaborado a base de esporas de *Trichoderma* spp.

Cada tres días y hasta el día 21 de incubación se tomaron muestras de 1,0 g, se hicieron diluciones decimales y se cuantificó el número de conidios g⁻¹ en cámara de Neubauer. Los datos se transformaron en log₁₀.

Al final del proceso fermentativo, tanto en los frascos de vidrio como en el biorreactor, después del secado, se separaron los conidios del sustrato mediante una máquina separadora de esporas confeccionada en la ESPOCH (Cajo y Valladares, 2007). Este producto del proceso fermentativo constituyó la formulación 1 (polvo seco) a la cual se le cuantificó el número de conidios por gramo de forma similar a la descrita previamente.

Los datos de la variable número de conidios g^{-1} en cada tiempo de incubación se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y las medias se compararon a través de la prueba de Mann Whitney para $p < 0,05$.

3.2.2 Selección de la formulación

Con el objetivo de seleccionar una formulación con potencial para el manejo de la enfermedad se compararon dos formulaciones según su eficacia en casa de cultivo. Posteriormente, se determinó la viabilidad de los conidios en el tiempo cuando se almacenaron las formulaciones en tres temperaturas.

Formulaciones

- **Formulación 1. Polvo seco.** Constituida por conidios de *Trichoderma* sp. sin otros aditivos.

Para el ensayo de eficacia en casa de cultivo se preparó una suspensión acuosa y la concentración se ajustó a $\sim 5 \times 10^9$ conidios mL^{-1} .

- **Formulación 2. Formulado líquido.** A partir de la formulación 1 se preparó una suspensión acuosa a la cual se adicionaron adyuvantes (melaza de caña de azúcar, almidón de maíz, extracto de maíz y extracto de levadura de cerveza).

Para el ensayo de eficacia en casa de cultivo la concentración se igualó a la de la formulación 1 ($\sim 5 \times 10^9$ conidios mL^{-1}) con agua estéril.

3.2.2.1 Eficacia en casa de cultivo

Para determinar la eficacia de las formulaciones frente al patógeno en casa de cultivo se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos, cinco plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA) con tres hojas inoculadas por tratamiento, para un total de 15 unidades experimentales y el ensayo se repitió dos veces. Los tratamientos consistieron en la aplicación de las dos formulaciones tres días después de inoculado el patógeno y un control de plantas inoculadas con *M. fijiensis*. Se incluyeron como controles absolutos plantas de banano sin inocular y plantas de bananos inoculadas con los componentes de la formulación 2 sin el antagonista.

Las plantas se colocaron en recipientes de 5,0 L de capacidad con sustrato compuesto por humus de lombriz, compost y turba en proporción 5:3:2 (V/V). La preparación de la suspensión micelial de *M. fijiensis* así como el proceso de inoculación artificial se llevaron a cabo según el protocolo descrito Leiva-Mora *et al.* (2010). La inoculación de *M. fijiensis* se realizó con un pincel sobre el envés de las tres hojas más jóvenes totalmente

extendidas y se utilizó gelatina 0,1% (m/v) como adherente. Se ajustó la concentración a $\sim 5 \times 10^5$ fragmentos de micelio mL^{-1} .

El riego se realizó por aspersión, los tres primeros días constante para mantener la humedad relativa al 100,0% y posteriormente tres veces al día para que estuviera por encima del 70,0%. La iluminación fue solar. La temperatura media durante el desarrollo del experimento fue de 26,4 °C (temperatura máxima 38,5 °C y mínima de 14,4 °C) y la humedad relativa media de 71,0% (humedad relativa máxima 99,0% y mínima de 43,0%).

Las aplicaciones de las formulaciones se hicieron con un aspersor manual, aproximadamente 1 mL por planta, tres días después de inocular el patógeno.

Las evaluaciones se realizaron a partir de los diez días posteriores a la inoculación hasta los 64 días (cada 5 días después de los 14 días). En cada una se determinó el estado de síntomas en las tres hojas de cada planta inoculadas con *M. fijiensis*, de acuerdo con la escala propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (2003) que incluye seis estados (Tabla 7).

Tabla 7. Escala para evaluación de estados de síntomas ocasionados por *M. fijiensis* sobre plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente en casa de cultivo según Alvarado-Capó *et al.* (2003).

Estado	Descripción
0	hoja sin síntomas,
1	hoja con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz,
2	hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de color pardo-rojiza por el envés de la hoja y sin síntomas por el haz,
3	hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el haz,
4	hoja con manchas negras (elípticas o circulares) con bordes cloróticos y halo acuoso. La hoja mantiene tejido verde,
5	hoja con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y pueden colgar del pseudotallo.

En los tratamientos donde se inoculó *M. fijiensis* se describió la frecuencia de aparición de los síntomas, se determinó el período de incubación (tiempo que media desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas)(días) y se calculó el índice de infección, el tiempo de evolución de los síntomas (tiempo desde que aparecen los primeros síntomas hasta la aparición de manchas grises con centro seco) (días) y el Tiempo de Desarrollo de la Enfermedad (TDE) (tiempo que media desde la inoculación hasta que aparecen manchas grises con centro seco) (días) según Carlier *et al.* (2002). Además, se calculó el estado de síntomas promedio, el Promedio Ponderado de Infección (PPI) según Orozco-Santos *et al.* (2013) y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) mediante la fórmula de Shaner y Finney (1977):

$$\text{AUDPC} = \sum_i^{n-1} \left(\frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

La eficacia de la aplicación en el control del patógeno inoculado artificialmente se determinó a través de la variable índice de infección a los 64 días posteriores a la inoculación mediante la fórmula: $\text{IIC-IIf} / \text{IIC} \times 100$, donde IIC representa el índice de infección en el control y IIf el índice de infección en plantas donde se aplicó la formulación.

Se seleccionó la formulación que presentó mayor eficacia en el control del patógeno y que mostró valores significativamente menores del resto de las variables con respecto al control.

Los datos de las variables: estado de síntomas promedio, índice de infección, PPI y ABCPE se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y las medias se compararon mediante la prueba de Mann Whitney para $p < 0,05$.

3.2.2.2 Viabilidad de las formulaciones en el tiempo

Para determinar la viabilidad en el tiempo de las formulaciones (polvo seco y formulado líquido) en tres temperaturas de almacenamiento (4,0; 14,0 y 22,0 °C) se determinó el número de conidios presentes y el número de conidios germinados (por g o mL) inicial (tiempo 0), a los 30, 40 y 60 días. La viabilidad se calculó como: $(\text{No. de conidios germinados} / \text{No. conidios presentes en la formulación al inicio del almacenamiento}) \times 100$.

Para ello, se tomaron muestras de 1,0 g (polvo seco) o 1,0 mL (formulado líquido) y se realizaron diluciones decimales, conteo de conidios en cámara de Neubauer y de conidios germinados sobre Agar agua al 3,0% (m/v) después de 24 h de incubación a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Con los datos se estimó el tiempo máximo de consumo o vida útil a través de la ecuación ajustada de la curva de regresión lineal. Se consideró como viabilidad límite el 85,0% de conidios germinados (Jenkins y Grzywacz, 2000) por g o mL a las temperaturas ensayadas. Se emplearon tres réplicas por tiempo de almacenamiento y el ensayo se repitió tres veces ($n=9$). Los datos de las variables número de conidios y número de conidios germinados se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y las medias se compararon a través de la prueba de Mann Whitney para $p < 0,05$.

3.3 Validación del potencial de biocontrol

3.3.1 Ensayo de eficacia en campo

La investigación se realizó en la hacienda “EL Pío IV” de propiedad del Grupo Agrícola Prieto en 1,3 ha, Parroquia Buena Vista, en el margen izquierdo de la carretera Pedregal-Río Negro, provincia de El Oro, ubicada a $03^\circ 16'$ latitud Sur y $79^\circ 57'$ longitud Oeste con

una altitud de 33 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Instituto Geográfico Militar, 2012). De acuerdo con las zonas de vida natural de Holdridge y el mapa ecológico del Ecuador, el sitio de la investigación corresponde a un bosque muy seco tropical (bms-T), con una precipitación media anual de 800 mm y una temperatura media de 24°C. El suelo fue de relieve plano, de textura arcillosa-arenosa (INIAP, Ecuador).

Las plantas se ubicaron en parcelas (unidades experimentales) de 352 m² (63 plantas por parcela) de acuerdo con un diseño de bloques al azar con siete tratamientos en un primer ensayo [formulación seleccionada en el acápite 3.2.2.1 en cinco dosis (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 L ha⁻¹), químico y control] y tres tratamientos en el segundo (formulación en una dosis seleccionada en el primer ensayo, químico y control). Cada tratamiento contó con 189 plantas (1 323 plantas en total en el primer ensayo y 567 en el segundo). La distancia entre surcos fue de 2,50 m, mientras entre plantas en la misma fila fue de 2,35 m para una población estimada de 1 700 plantas por hectárea. El período de emisión foliar estuvo entre 0.8 y 1.2.

El riego se realizó de acuerdo con las necesidades del cultivo usando aspersores Senninger 30-12 (0,765m³ h⁻¹). No se empleó control químico de las malezas. Este se efectuó en forma mecanizada con una rozadora marca motor 2T SOLO 140. Como cobertura vegetal se emplearon plantas de Kutzu (*Pueraria* sp.) en toda el área del ensayo con el fin de mantener la humedad y controlar el crecimiento de malezas. Cada dos surcos de plantas se construyeron surcos de drenaje, para eliminar el excedente de agua después del riego.

La fertilización de las plantas y las prácticas culturales y agronómicas fueron las establecidas por el Grupo Agrícola Prieto para el cultivo orgánico en la hacienda.

En el tratamiento donde se empleó la formulación del bioproducto (siempre sin aceite) no se utilizaron otros fungicidas. La primera aplicación se efectuó 30 días después de la plantación. Posteriormente, a partir de los seis meses de la plantación las aplicaciones se realizaron cada 15 días, pero en época de lluvia la frecuencia fue cada 8 ó 12 días según las condiciones climatológicas y la infección del patógeno. Al comienzo las aplicaciones se efectuaron con bomba CP3 con boquilla 08 de cono, dirigiendo la aplicación del producto hacia el envés de la hoja. Cuando las plantas alcanzaron una altura de 1,20 m, las aplicaciones se realizaron con la motobomba nebulizadora para obtener una mayor cobertura en menor tiempo. Todas las aplicaciones se hicieron en la superficie abaxial de la hoja.

El tratamiento químico incluyó la rotación de fungicidas que se aplicaron a las dosis recomendadas por los fabricantes y frecuencia similar a la formulación del bioproducto, e

incluyeron Amistar (Azoxistrobina), Benocor (Benomyl), Folicur (Tebuconazole), Tilt y Strike (Propiconazol), Oxithano (Mancozeb + Cu). Como control absoluto se incluyeron plantas sin tratamiento.

Las evaluaciones se realizaron en diez plantas seleccionadas al azar de los surcos centrales de cada parcela. La severidad de la enfermedad se evaluó visualmente mediante la escala de Stover (Stover, 1976) modificada por Gauhl (1990).

En un primer ensayo con el objetivo de seleccionar una dosis de la formulación del bioproducto se calculó el índice de infección en cada tratamiento mediante la fórmula descrita por Carlier *et al.* (2002) durante los cinco meses previos a la floración. Con estos valores se calculó la eficacia según la fórmula: $E = \frac{I_{lc} - I_{lt}}{I_{lc}} \times 100$, donde I_{lc} : Índice de Infección en el control; I_{lt} : Índice de infección en el tratamiento.

Con la dosis seleccionada se realizó un segundo ensayo durante dos ciclos de cultivo al cual a los tres y seis meses después de la siembra y en la floración se midió la altura (cm), se cuantificó el número total de hojas y se calculó el área foliar (m^2) (largo x ancho x 0,8). Además, se determinó la hoja más joven con síntomas, la hoja más joven manchada, el promedio ponderado de infección (Marín y Romero, 1992; Orozco-Santos *et al.*, 2013), el índice de infección (Carlier *et al.*, 2002) y la eficacia (según fórmula descrita más arriba). Todas las evaluaciones se hicieron semanalmente.

En el segundo ciclo de cultivo se evaluaron en la cosecha las variables número de hojas por planta, área foliar (m^2), número de semanas de la floración a la cosecha, hoja más joven con síntomas, hoja más joven manchada, promedio ponderado de infección, índice de infección, eficacia, número de manos por racimo, masa fresca del racimo (kg), masa fresca del raquis (kg), diámetro (mm) y longitud (cm) del dedo del centro de la segunda y última mano, peso neto de la fruta (g) y relación caja/racimo.

Los datos de las variables evaluadas se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y las medias se compararon a través de la prueba de Mann Whitney para $p < 0,05$.

3.3.2 Análisis económico

Se realizó un análisis económico de Presupuesto Parcial según la metodología de Perrín *et al.* (1987) que toma en consideración los costos que varían. Para ello se tomaron todos los costos variables (insumos y aplicaciones) y costos fijos (mano de obra) que restados del beneficio bruto (precio de venta de la caja de banano) dieron el beneficio neto. Con el beneficio neto y los costos variables se procedió a realizar el análisis de dominancia (tratamiento dominado es aquel que a igual o mayor beneficio neto presenta un mayor costo variable). Con los tratamientos no dominados se procedió a realizar el análisis

marginal para la obtención de la tasa de retorno marginal. Para este análisis se emplearon los datos del segundo ensayo de eficacia en campo.

3.3.3 Compatibilidad con productos empleados en bananeras orgánicas

Este ensayo se realizó para determinar la compatibilidad de la cepa de *Trichoderma* (seleccionada en el acápite 3.1.3 para elaborar la formulación a base de conidios), con productos empleados en las bananeras. Se incluyeron estimulantes foliares, fungicidas y un fijador para un total de 18 (Tabla 8) y se emplearon tres dosis, definidas a partir de la que recomienda la casa comercial proveedora. La dosis 1 (baja) se consideró como la mitad de la recomendada (D1), la dosis 2 (media) la recomendada (D2) y la dosis 3 (alta) el doble de la recomendada (D3).

Los productos se disolvieron en agua destilada estéril en concentración equivalente a las dosis descritas y se añadieron al medio de cultivo PDA recién esterilizado cuando la temperatura alcanzó ~40-45°C. Posteriormente, se distribuyó en placas de Petri de 90,0 mm de diámetro. En el centro de cada placa se colocó un disco de micelio de 0,2 cm de diámetro tomado del borde de una colonia de la cepa crecida durante 48 h a 27±1°C y luz continua incandescente de 40 W. Las placas se incubaron durante nueve días en similares condiciones y cada tres días se midió el crecimiento radial de las colonias (mm).

Se emplearon tres placas por cada dosis y producto y un control. El experimento se repitió tres veces. Los datos del crecimiento radial de las colonias en presencia de los productos se compararon con el control y se realizaron análisis de regresión lineal. Mediante las ecuaciones de la curva de regresión ajustada se calculó la dosis letal media (DL50) (considerada como la dosis de producto que es capaz de inhibir el crecimiento del hongo antagonista en un 50,0%). Se consideró compatible cuando la DL50 fue menor que la dosis recomendada por la casa comercial.

Tabla 8. Ingrediente activo y dosis empleadas en experimento con 18 productos de uso en las bananeras orgánicas.

Nombre Comercial	Tipo	Ingrediente activo	Dosis baja (D1)	Dosis media (D2)*	Dosis alta (D3)
Mil-agro	FUNGICIDA	Metal Tiofanato - N	0,4 L ha ⁻¹	0,8 L ha ⁻¹	1,6 L ha ⁻¹
Kaligreen	FUNGICIDA	Bicarbonato de potasio	0,5 kg ha ⁻¹	1,0 kg ha ⁻¹	2,0 kg ha ⁻¹
Krypton	FUNGICIDA	Metalsulfoxilate	0,4 mL L ⁻¹	0,8 mL L ⁻¹	1,6 mL L ⁻¹
Tagushi	FUNGICIDA	Aceites esenciales de manzanilla y toronja	100,0 mL ha ⁻¹	200,0 mL ha ⁻¹	400,0 mL ha ⁻¹
3B112	FUNGICIDA	Aceites esenciales y sales minerales	100,0 mL ha ⁻¹	200,0 mL ha ⁻¹	400,0 mL ha ⁻¹
Cupront	FUNGICIDA	Sulfato de cobre pentahidratado	0,5 mL L ⁻¹	1,0 mL L ⁻¹	2,0 mL L ⁻¹
Tritón	FUNGICIDA	Etoxilato de Octilfenol	2,0 mL L ⁻¹	4,0 mL L ⁻¹	8,0 mL L ⁻¹
Aceite agrícola	FUNGICIDA	Aceite mineral refinado	0,2 L L ⁻¹	0,4 L L ⁻¹	0,8 L L ⁻¹
Benomyl	FUNGICIDA	Benomyl	140,0 g ha ⁻¹	280,0 g ha ⁻¹	560,0 g ha ⁻¹
Tilt	FUNGICIDA	Propiconazol	0,2 L ha ⁻¹	0,4 L ha ⁻¹	0,8 L ha ⁻¹
Biopalma	FUNGICIDA	Ésteres de ácidos grasos	0,2 L L ⁻¹	0,4 L L ⁻¹	0,8 L L ⁻¹
Oilpalma	FUNGICIDA	Ésteres de ácidos grasos	0,2 L L ⁻¹	0,4 L L ⁻¹	0,8 L L ⁻¹
Preparación a+b	FUNGICIDA	Surfactante + aceite vegetal + ángel	1,25 mL L ⁻¹ + 0,2 L L ⁻¹ + 13,2 mL L ⁻¹	2,50 mL L ⁻¹ + 0,4 L L ⁻¹ + 26,4 mL L ⁻¹	5,00 mL L ⁻¹ + 0,8 L L ⁻¹ + 52,8 mL L ⁻¹
Surfactante	FIJADOR	Poliéter, Polymetilsiloxano	1,25 mL L ⁻¹	2,50 mL L ⁻¹	5,00 mL L ⁻¹
Ángel	ESTIMULANTE FOLIAR Y FUNGICIDA	Ácidos húmicos, carbohidratos, polisacáridos y aminoácidos	13,2 mL L ⁻¹	26,4 mL L ⁻¹	52,8 mL L ⁻¹
Katabión	ESTIMULANTE FOLIAR	Manganeso, zinc, boro, cobre, hierro	7,95 mL L ⁻¹	15,90 mL L ⁻¹	31,8 mL L ⁻¹
Biosolar	ESTIMULANTE FOLIAR	Glucosa, disacáridos, calcio, aminoácidos	0,5 L ha ⁻¹	1,0 L ha ⁻¹	2,0 L ha ⁻¹
Bioestimulante	ESTIMULANTE FOLIAR	Aminoácidos, nitrógeno, fósforo, potasio, boro, molibdeno.	0,5 L ha ⁻¹	1,0 L ha ⁻¹	2,0 L ha ⁻¹

3.4 Sistema de control de la calidad y registro del bioproducto

3.4.1 Control de la calidad

Para establecer un sistema de control de la calidad se analizó todo el flujo productivo del bioproducto, así como los flujos de apoyo (insumos, equipamientos, mantenimiento, etc.). Se tuvieron en cuenta aspectos metodológicos referidos por Suárez-Castellá *et al.* (2009) para sistemas de control de la calidad de laboratorios para la producción de plantas *in*

vitro aplicables en este caso. Se identificaron los parámetros de calidad del producto final a partir de los resultados de los acápite anteriores. Con todo lo anterior se definieron los puntos críticos del proceso productivo para garantizar la calidad en el proceso y del producto final, así como los factores que influyen en ella. Al mismo tiempo, se propusieron acciones de control del proceso y al producto final.

Con los resultados se elaboró un documento que incluyó todas las operaciones, acciones de control y aseguramiento así como las buenas prácticas de producción con énfasis en aspectos relativos a la bioseguridad. Posteriormente, se capacitó al personal que labora en la producción del bioproducto, se implementó y verificó el funcionamiento del sistema y se perfeccionó en base a las deficiencias detectadas. Cada punto de control del sistema incluyó una descripción general de las operaciones, el tipo de control, variables a controlar, procedimiento de control y medidas.

3.4.2 Elaboración de documentación para el registro del bioproducto

Para el registro del producto se aplicaron las reformas dadas por Decreto Ejecutivo No. 818, publicado en Registro Oficial 499 de 26 de Julio de 2011 que constan en el Texto Unificado de Legislación Secundaria del MAG, LIBRO I (MAG, 2012). Se tuvieron en cuenta los resultados de este trabajo, así como otros obtenidos en trabajos previos realizados en el laboratorio de Fitopatología (Mikroben) de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH. Conjuntamente, se asignó un nombre a la marca del bioproducto y se diseñó una etiqueta. Los datos requeridos fueron los siguientes:

1. Nombre genérico (científico).
2. Tipo de plaguicida (insecticida, fungicida biológico, etc.).
3. Datos completos del grupo que lo produce, usos y formulaciones (plaga que controlará, tipos de cultivo, tipos de formulaciones (polvos humedecibles, concentrados líquidos).
4. Métodos de aplicación (preparado disuelto en agua con adyuvantes, equipos de aplicación, cantidad que se aplica, etc.).
5. Literatura científica que apoye seguridad de uso.
6. Determinar los pasos críticos del proceso productivo para evaluar posible contaminación microbiana y cuando esta ocurra asegurar que en ningún lote haya patógenos humanos o animales.
7. Características físicas y químicas (pH, densidad, color, olor).
8. Pruebas de calidad biológicas.
9. Elementos de bioseguridad en la producción de bioplaguicidas.
10. Buenas Prácticas de producción y diseño de instalaciones.
11. Estudios de patogenicidad en especies no diana.
12. Baterías de ensayos con animales de laboratorio que incluyan mamíferos por diferentes vías: oral, inhalación, tópica, intravenosa.

13. Estudios ecotoxicológicos (peces, aves, abejas), algunos de los cuales no se aplican según el uso al que va dirigido el producto.

14. Destino del producto en el ambiente (por ejemplo si contamina estuarios, ríos, etc.).

Los datos correspondientes a los numerales del uno al diez se obtuvieron de las evidencias experimentales contenidas en este trabajo de tesis y de estudios previos realizados por el Laboratorio de Sanidad Vegetal, Sección Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH. Los estudios contenidos en los numerales del 11 al 14 se realizaron en la Facultad de Ciencias Químicas de la ESPOCH y en la certificadora alemana con sede en Ecuador BCS. Con todos los resultados se confeccionó un expediente que se presentó al Ministerio de Agricultura para su verificación y aprobación según los esquemas previstos (Anexos 2 y 3) y que contenía los resultados en el siguiente orden:

A) Del ingrediente activo

Identidad, propiedades físico-químicas, aspectos relacionados con su utilidad, efectos tóxicos en especies mamíferas, efectos tóxicos en otras especies (peces, palomas, lombrices, abejas), residuos en productos tratados, efectos sobre el medio ambiente, Información con respecto a la seguridad, métodos analíticos.

B) Del producto técnico

Nombre y dirección del fabricante, dirección donde se fabrica, apariencia (estado físico, color, olor.), contenido mínimo y máximo del ingrediente activo (tolerancia $\pm 3,0\%$), identidad y cantidad de isómeros, impurezas y otros productos expresados en gramos/kg.

C) Del producto formulado

Descripción general (Nombre comercial, concentración, formulación, clase de uso, etc.), composición (contenido de la sustancia activa o agente causal y de los demás componentes incluidos en la formulación), propiedades físico-químicas, propiedades físicas del producto formulado relacionadas con su uso (persistencia de espuma, corrosividad, incompatibilidad con otros productos, punto de inflamación, etc.), datos de aplicación del producto formulado (indica la dosis, época y frecuencia de aplicación, métodos de aplicación, instrucciones de uso, fecha de reingreso al área tratada, períodos de carencia, efectos sobre cultivos sucesivos, fitotoxicidad, etc.). Esta información deberá ser sustentada con el ensayo de eficacia.

Un esquema general sobre la organización del trabajo de tesis se incluye en la figura 4.

Bioproducto a base de una cepa nativa de *Trichoderma* spp. para el manejo de la Sigatoka negra en bananeras orgánicas

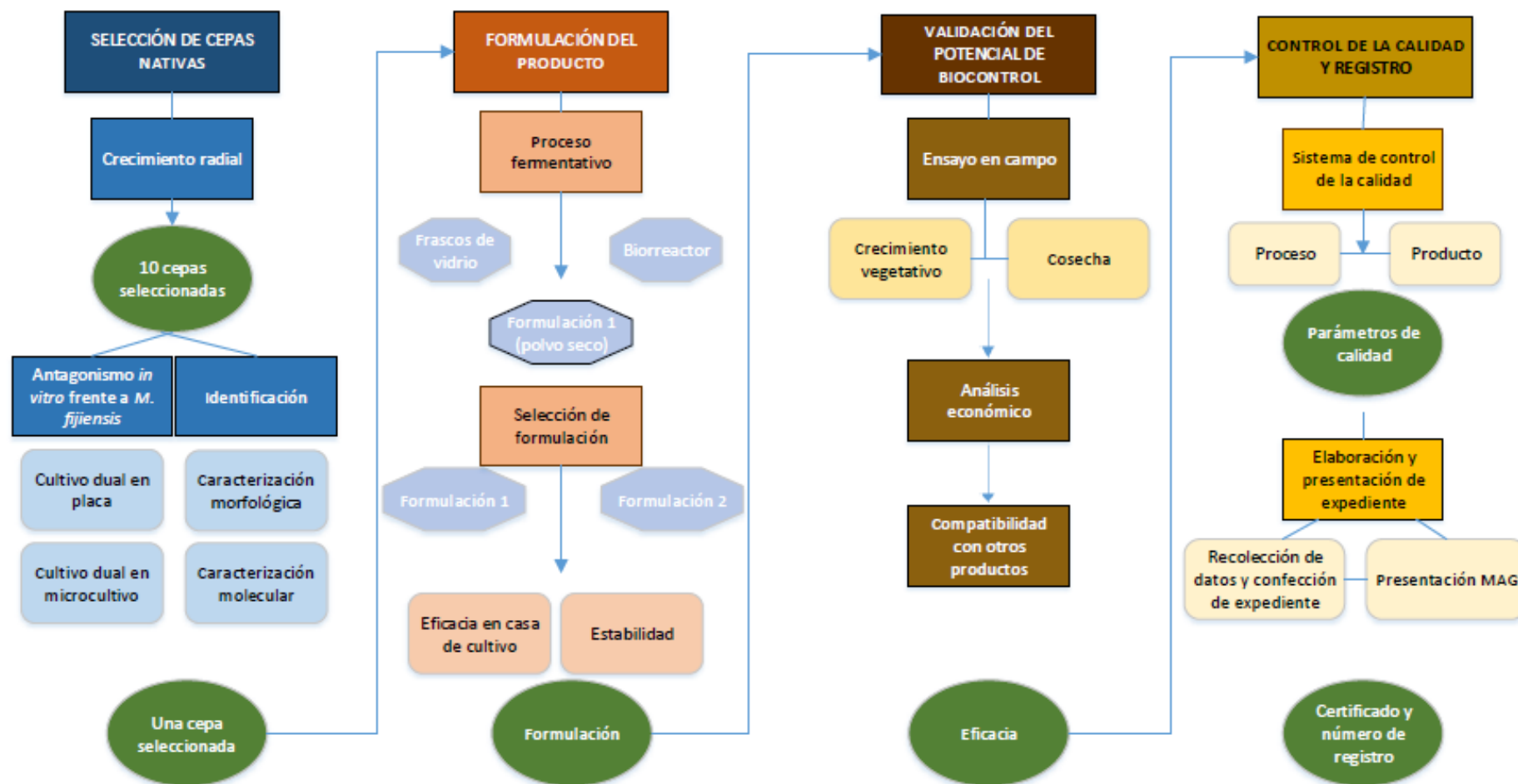


Figura 4. Esquema organizativo del trabajo de tesis.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp.

4.1.1 Crecimiento radial

Todas las cepas de *Trichoderma* (100) crecieron en el medio de cultivo PDA y la mayoría (67) lo cubrió totalmente a las 120 h de incubación. Sin embargo, se observaron diferencias entre las cepas en cuanto a la velocidad de crecimiento. El análisis de conglomerados a las 24, 48 y 72h permitió observar la formación de dos grupos de cepas. En el primero se ubicaron 14 cepas las que a 48 h habían alcanzado el valor máximo de radio de la colonia (45,0mm) y en el segundo el resto de las cepas en subgrupos (Figura 5, Tabla 9). Los grupos formados en base al crecimiento radial en el tiempo no estuvieron asociados a los sitios de aislamiento. El coeficiente cofenético fue de 0,851. La velocidad de crecimiento de las cepas del primer grupo osciló entre 0,52 y 0,90 mm h⁻¹ a las 24 h de incubación y a las 48h se igualaron a 0,90 mm h⁻¹.

Estos resultados se corresponden con los informados por otros autores quienes han estudiado el crecimiento de cepas de *Trichoderma* spp. en condiciones *in vitro*. Por ejemplo, Rivas (1994) evaluó el crecimiento de cepas de *Trichoderma pseudokoningii*, que cubrieron totalmente el medio de cultivo en placas de Petri a las 72 horas de incubación. Otros autores como Hernández *et al.* (2011) también lograron diferenciar aislados de *Trichoderma* nativos de México en base a su crecimiento *in vitro*.

En el desarrollo de bioproductos para el control de patógenos fúngicos se requiere hacer una selección de las cepas que cuenten con las características deseadas para el control del patógeno diana (Stefanova, 2007; Martínez *et al.*, 2013). En este trabajo la selección primaria de las cepas se basó en su velocidad de crecimiento en un medio de cultivo ya que esta variable es indicativa de la capacidad del microorganismo de competir y colonizar un sustrato (Monte, 2001; Martínez *et al.*, 2013). Este aspecto es importante en un proceso productivo donde los costos deben ser bajos y con aquellas cepas de mayor velocidad de crecimiento se requerirán tiempos menores para obtener el ingrediente activo del bioproducto deseado. Por otra parte, el bioproducto a base de una cepa nativa de *Trichoderma*, que es objetivo de este trabajo, se pretende aplicar en la superficie foliar de plantas de banano donde el patógeno *Mycosphaerella fijiensis* crece epifíticamente antes de penetrar por los estomas. Por ello, las cepas que se seleccionen deben tener la capacidad de crecer a alta velocidad. Ello le facilitaría ocupar el área foliar antes que el hongo fitopatógeno. El crecimiento rápido de las especies de *Trichoderma* es una de sus características distintivas, que les permite colonizar y hacer un uso eficiente de diferentes sustratos (Shuter y Schmoll, 2010).

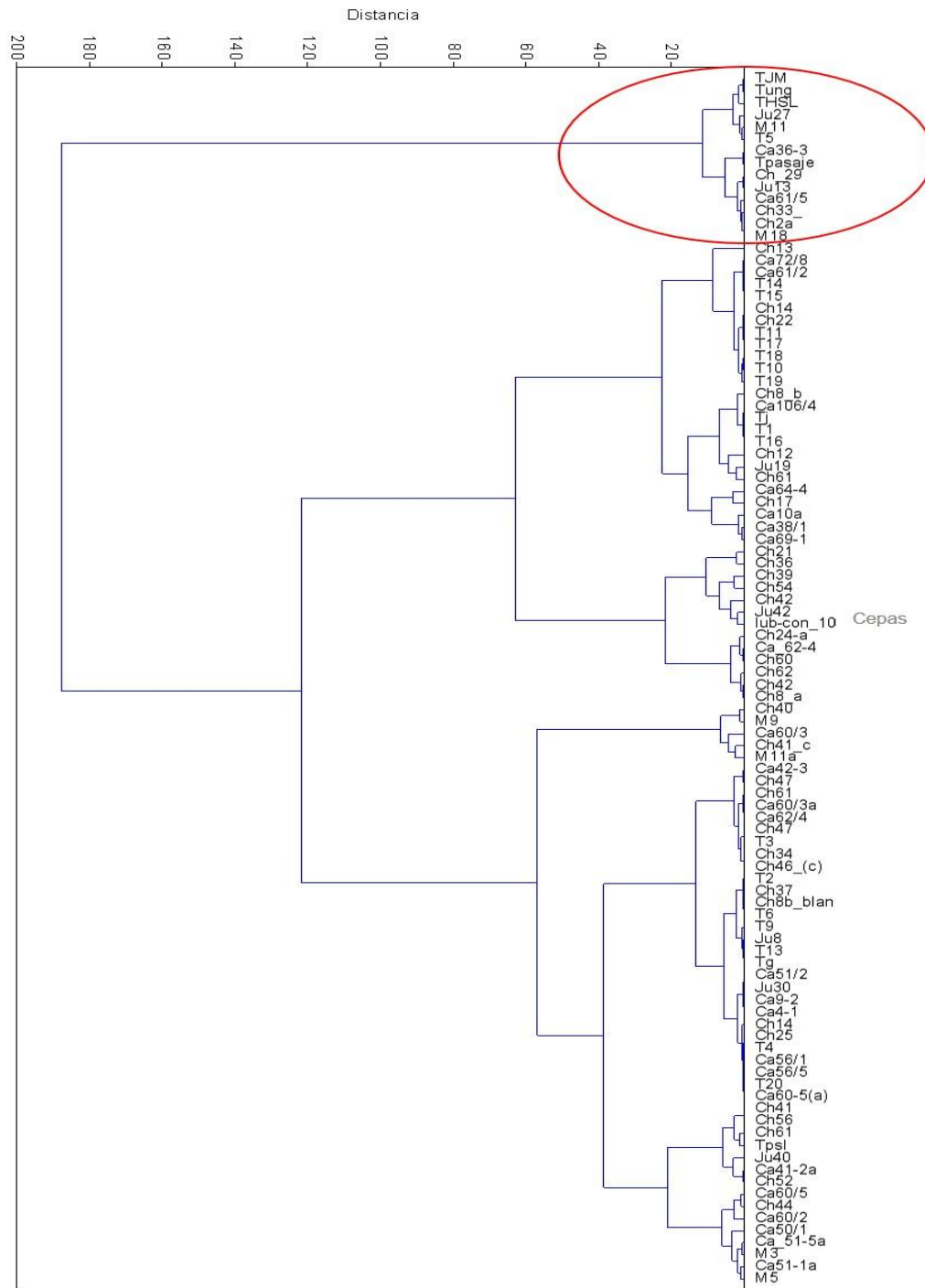


Figura 5. Dendrograma construido mediante el método de Ward utilizando distancia euclidiana, para la agrupación de 100 cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelo, en base a su crecimiento radial en medio de cultivo PDA. Incluye los datos del crecimiento a las 24, 48 y 72h de incubación. Cepas señaladas en círculo rojo habían cubierto toda la superficie del medio de cultivo a las 48h de incubación.

Tabla 9. Cepas de *Trichoderma* spp. ubicadas en el grupo 1 según su crecimiento radial en medio de cultivo PDA.

No	Código	Localidad	Provincia	Región
1	CCCh-Ca36-3	Hacienda Agrícola del Pacífico-Marcelino Maridueña	Guayas	Costa
2	CCCh-Ca61/5	Cajamba	Chimborazo	Sierra
3	CCCh-Ch29	Chambo	Chimborazo	Sierra
4	CCCh-Ch2a	Chambo	Chimborazo	Sierra
5	CCCh-Ch33	Chambo	Chimborazo	Sierra
6	CCCh-Ju13	Carretera-Puerto Inca	El Oro	Costa
7	CCCh-Ju27	Hacienda Los Ángeles-Pasaje-Buena Vista	El Oro	Costa
8	CCCh-M11	Hacienda Lilita-Pasaje	El Oro	Costa
9	CCCh-M18	Hacienda La Izquierda-Buena Vista	El Oro	Costa
10	CCCh-p1	Hacienda Pio IV-Pasaje-Buena Vista	El Oro	Costa
11	CCCh-T5	Hacienda Agrícola El Rosario-Guabo-5 de Junio	El Oro	Costa
12	CCCh-THSL	San Lorenzo	Esmeraldas	Costa
13	CCCh-TJM	Hacienda Pongarbel-Carretera a Jújan-Grupo Marún	Los Ríos	Costa
14	CCCh-Tung	Hacienda Kimberly-La Unión	El Oro	Costa

Del primer grupo de cepas (14) se seleccionaron diez cuyo origen se relacionaba con sitios donde se cultivaban bananos en la región Costa en Ecuador (1, 6-14).

Estas cepas se caracterizaron por su esporulación abundante en medio de cultivo PDA, color verde o amarillo pálido, color de reverso blanquecino a amarillo y en algunas se observaba la formación de pústulas (Figura 6).

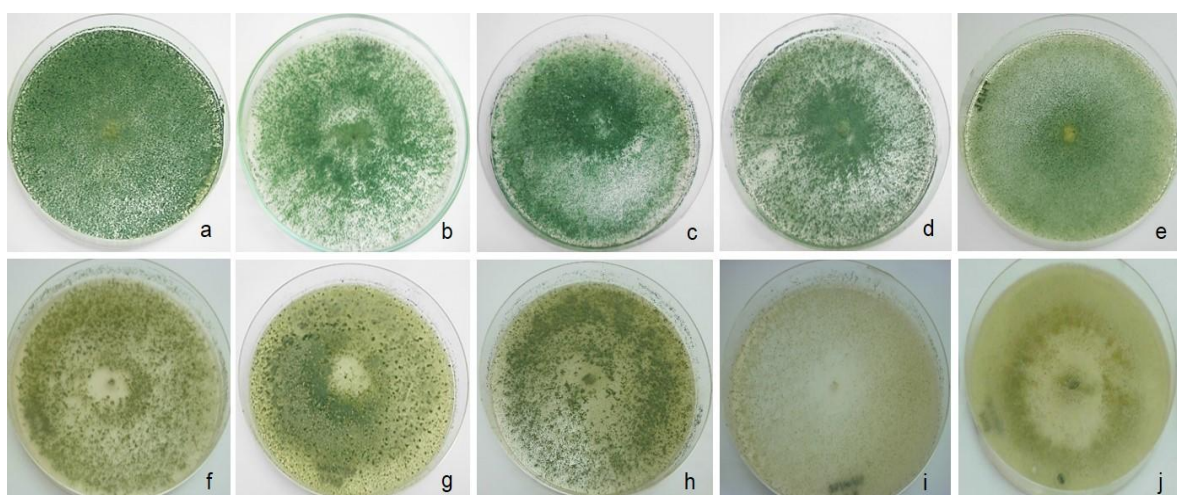


Figura 6. Cepas de *Trichoderma* spp. seleccionadas según su velocidad de crecimiento. Cultivos en PDA después de 5 días de incubación a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y luz continua. a) CCCh-M18, b) CCCh-p1, c) CCCh-M11, d) CCCh-TJM, e) CCCh-THSL, f) CCCh-Ju27, g) CCCh-Ju13, h) CCCh-Ca36-3, i) CCCh-T5, j) CCCh-Tung.

4.1.2 Antagonismo *in vitro* frente a *M. fijiensis*

Se observó antagonismo *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* spp. seleccionadas frente a la cepa de *M. fijiensis* CCCh-Mf1, tanto en cultivo dual en placa como en los microcultivos (Figura 7 a-d).

El crecimiento de *M. fijiensis* en medio de cultivo PDA es lento, sus colonias son compactas y aterciopeladas (Meredith y Lawrence, 1969). Por ello, a las 120 h no se habían producido cambios en el crecimiento radial de la colonia, mientras las cepas de *Trichoderma* spp. habían cubierto totalmente el medio de cultivo desde las 48h y sobrecrecido la colonia del patógeno (Figura 7bc). Por esta razón, no se pudo emplear la variable porcentaje de inhibición del crecimiento que comúnmente se utiliza en estudios de antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Guijón-López *et al.*, 2010; Bae *et al.*, 2011). Estos resultados evidenciaron el potencial de competencia por espacio y por los nutrientes del medio de cultivo y se clasificó la capacidad antagónica de grado 1 (*Trichoderma* sobrecrece completamente el patógeno y cubre totalmente la superficie del medio de cultivo) según la escala de Bell *et al.* (1982). Sin embargo, mediante este método no fue posible establecer diferencias entre las cepas de *Trichoderma* spp.

La forma del antagonismo, teniendo en cuenta los criterios de Davet *et al.* (1981), se clasificó como micoparasitismo ya que las hifas del antagonista recubrieron las del patógeno entrelazando o entrecruzándose con este y ocuparon todo el espacio vital (Figura 7b). La intensidad del antagonismo se consideró elevada porque se inhibió en un 100% el crecimiento de *M. fijiensis* y se observó esporulación de las cepas de *Trichoderma* sobre el micelio del patógeno (Figura 7c). En observaciones microscópicas de la zona de contacto no se observó enrollamiento ni penetración de las hifas de *Trichoderma* en las de *M. fijiensis* pero sí ruptura de hifas y derrame del contenido celular, lo cual se observó con mayor detalle en los microcultivos (Figura 7).

Estos resultados coinciden con los descritos por otros investigadores. En estudios de enfrentamiento *in vitro* de cepas de *Trichoderma* con *M. fijiensis*, Arzate-Vega *et al.* (2006) indicaron que el micelio del antagonista hizo contacto con el patógeno en cultivo dual a las 24h de incubación en todas las cepas evaluadas y que el antagonismo se clasificó de grado 1. Más recientemente, Alvindia (2012) informó sobre la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* en cultivo dual con la cepa de *T. harzianum* DGA01, aislada de frutos de banano, después de 10 semanas de incubación. Este autor destacó como la característica más importante del antagonista su rápido crecimiento, que en 48h le permitió cubrir totalmente el medio de cultivo en una placa de Petri de 90,0 mm de diámetro. Por su parte, Acosta-Suárez *et al.* (2013) demostraron en un estudio similar que

una cepa de *Trichoderma harzianum* inhibió el crecimiento de *M. fijiensis* por competencia y micoparasitismo.

A través del cultivo dual mediante microcultivos se observaron daños en la integridad de la pared celular de las hifas de *M. fijiensis* (lisis), vacuolización y derrame del contenido celular (Figura 7e-i) que confirmaron el micoparasitismo. Estos resultados sugieren la posible presencia de enzimas extracelulares de *Trichoderma* con actividad lítica sobre las hifas del patógeno. Otros autores han referido la producción de enzimas quitinasas, glucanasas y proteasas por especies de *Trichoderma* que contribuyen a la degradación de las paredes celulares de los microorganismos patógenos (Viterbo *et al.*, 2002; Neves *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013). Según Mukherjee *et al.* (2012), el micoparasitismo representa la culminación de la competencia por recursos entre *Trichoderma* y su hongo hospedante. En esta interacción, la producción de enzimas hidrolíticas y antibióticos están entre los principales recursos del arsenal químico desplegado por *Trichoderma* para eliminar a otros hongos. Se ha comprobado que su genoma está enriquecido con genes que codifican para la producción de quitinasas y glucanasas, así como otros metabolitos secundarios (Hermosa *et al.*, 2012). Se requieren otros estudios que permitan profundizar en la identificación del tipo de enzimas líticas producidas por estas cepas de *Trichoderma* y cuantificarlas en la interacción con *M. fijiensis*.

Los resultados de esta investigación se corresponden con estudios previos sobre la capacidad antagonista *in vitro* de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos. Por ejemplo, se ha referido que degrada la pared celular y destruye las hifas y estructuras reproductivas de *Sclerotium cepivorum* Berk (Vera *et al.*, 2005), alta capacidad antagónica contra *Rhizoctonia solani* Kühn con diferentes tipos de interacción hifal como lisis, vacuolización, enrollamiento y penetración (Martínez *et al.*, 2008), así como inhiben por competencia e hiperparasitismo el crecimiento de *Macrophomina phaseolina* Tassi (Goid) y *Fusarium oxysporum* Schl.Tdl (Hernández *et al.*, 2011), entre otros. Igualmente, frente a *M. fijiensis* autores como Acosta-Suárez *et al.* (2013) han indicado estas evidencias de micoparasitismo.

Los resultados experimentales de este trabajo corroboraron el potencial de *Trichoderma* spp. como antagonista *in vitro* de *M. fijiensis*.

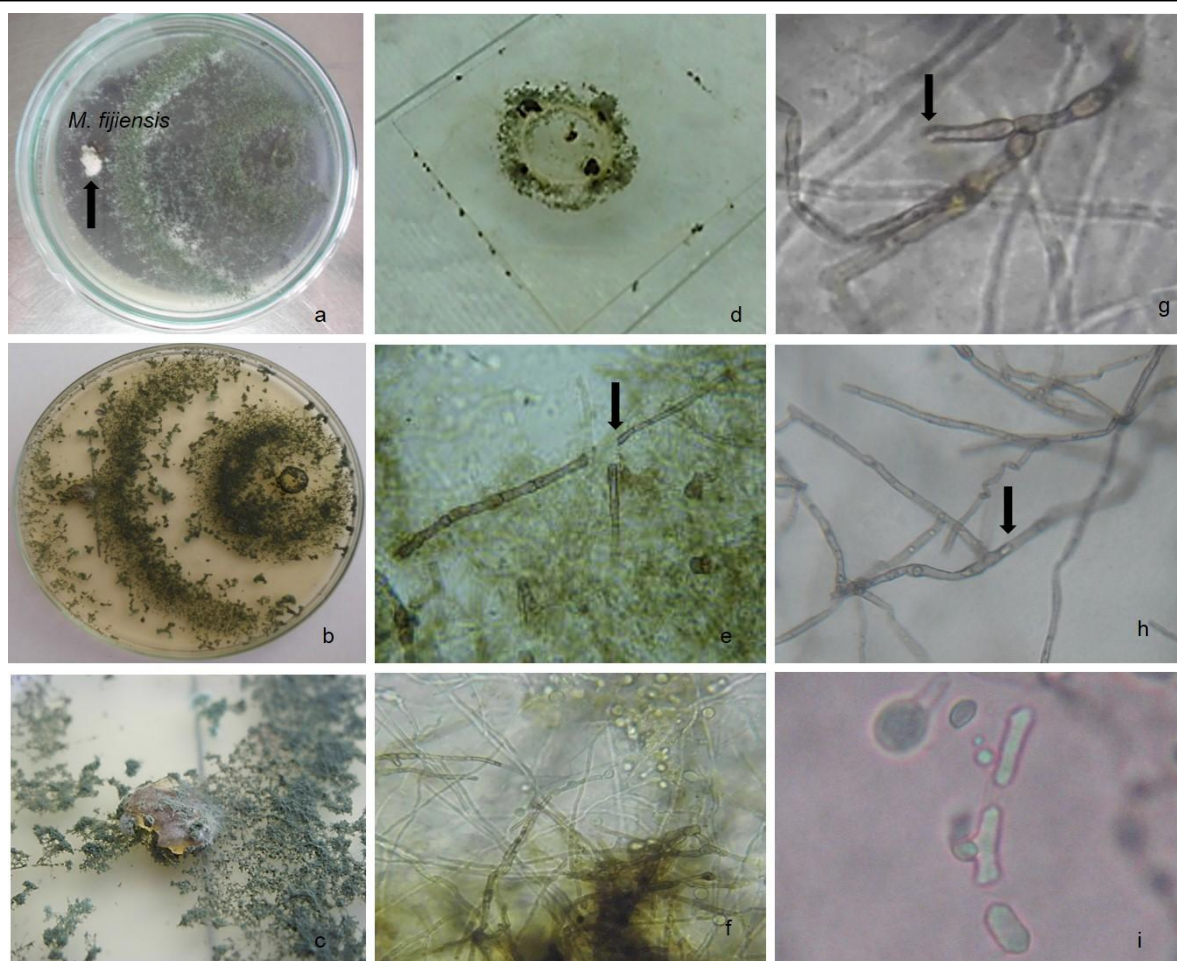


Figura 7. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis* CCCh-Mf1. a, b, c. Cultivo dual en placa de Petri. a. 48h de incubación, b. 120h de incubación, c. sobrecrecimiento y esporulación de *Trichoderma* spp. sobre *M. fijiensis*. d-i. Cultivo dual en microcultivos. e, f entrecruzamiento de hifas de los dos hongos; hifas hialinas pertenecen a *Trichoderma* e hifas pigmentadas a *M. fijiensis*. Aumento 400x. e, g. lisis y derrame del contenido celular. Aumento 400x. h, i. Vacuolización. Aumento 1000x.

4.1.3 Identificación

Las diez cepas se caracterizaron por su rápido crecimiento en medio de cultivo PDA a 27 ± 1 °C y la producción de conidios en presencia de luz. Los caracteres culturales (color de la colonia, color del reverso, esporulación) mostraron variaciones entre las cepas. En este medio de cultivo, las colonias al comienzo tenían color blanco o amarillo pálido y posteriormente verde o verde amarillo.

Las características morfológicas coincidieron con las descripciones realizadas por otros autores para el género *Trichoderma* (Rifai, 1969; Bisset, 1984; Bissett, 1991; Kubicek y Harman, 1998; Samuels *et al.*, 2006). Estas incluyeron hifas hialinas, septadas y de paredes finas, conidióforos hialinos, generalmente ramificados que se forman de las hifas en un ángulo de 90° y en ocasiones llegan a tener una disposición piramidal, fiálides hialinas, que pueden ser solitarias o dispuestas en verticilos y producen los conidios en el extremo. Todas las cepas produjeron conidios y clamidosporas en las condiciones de

incubación evaluadas. Estas últimas se observaron terminales o intercalares. Las principales características por cepa se presentan en las Tablas 10 y 11.

Tabla 10. Características culturales y morfológicas de 10 cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelo.

Código	Colonia (PDA)		Clamidosporas	Fiálides intercalares
	Color	Textura		
CCCh-Ca36-3	Verde amarillo	Flocosa	subglobosas a elipsoidales	+
CCCh-Ju13	Verde amarillo	Flocosa	subglobosas a elipsoidales	+
CCCh-Ju27	Verde amarillo	Flocosa	subglobosas a elipsoidales	+
CCCh-M11	verde	Flocosa	globosas	-
CCCh-M18	verde	Pulverulenta	globosas	-
CCCh-p1	verde	Pulverulenta	globosas	-
CCCh-T5	Verde amarillo	Flocosa	subglobosas a elipsoidales	+
CCCh-THSL	Verde amarillo	Flocosa	subglobosas a elipsoidales	+
CCCh-TJM	verde	Flocosa	globosas	-
CCCh-Tung	Verde amarillo	Flocosa	subglobosas a elipsoidales	+

+ Presencia - Ausencia

Tabla 11. Características de los conidios de diez cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelo.

Código	CONIDIOS					
	Forma	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Relación L/A	Ornam.	Color
CCCh-Ca36-3	Elipsoides	2,1-4,8 (3,4)*	1,8-4,0 (3,0)	1,1-1,2 (1,1)	Lisos	Verde claro
CCCh-Ju 13	Elipsoides	2,5-7,8 (4,9)	2,0-4,0 (3,0)	1,2-1,9 (1,6)	Lisos	Verde claro
CCCh-Ju 27	Elipsoides	2,9-3,4 (3,2)	2,5-4,3 (3,3)	0,8-1,1 (1,0)	Lisos	Verde claro
CCCh-M11	Cilíndricos	2,7-9,7 (6,4)	1,2-5,0 (3,4)	1,7-2,2 (1,9)	Lisos	Verde azul
CCCh-M18	Subglobosos	2,0-4,9 (3,4)	1,8-4,0 (2,9)	1,0-1,2 (1,1)	Lisos	Verde claro
CCCh-p1	Subglobosos	3,0-3,5 (3,3)	2,7-4,4 (3,5)	0,8-1,1 (0,9)	Lisos	Verde claro
CCCh-T5	Elipsoides	2,6-9,8 (6,0)	1,3-4,9 (3,0)	1,9-2,1 (2,0)	Lisos	Verde claro
CCCh-THSL	Elipsoides	2,5-9,7 (6,2)	1,2-5,0 (3,4)	1,6-2,0 (1,8)	Lisos	Verde claro
CCCh-TJM	Cilíndricos	3,0-5,0 (4,0)	1,9-4,3 (3,2)	1,1-1,5 (1,3)	Lisos	Verde azul
CCCh-Tung	Elipsoides	3,1-3,5 (3,3)	2,6-4,4 (3,5)	0,8-1,1 (0,9)	Lisos	Verde claro

*Valores medios, n=30. Ornam. Ornamentación de los conidios

La caracterización de los conidios de las cepas seleccionadas resultó útil en la identificación de las mismas. Según Samuels *et al.* (2006) los conidios representan el carácter morfológico más consistente, ya que pueden ser medidos y su morfología se mantiene constante después de sucesivas transferencias.

En este estudio se corroboró el criterio de otros investigadores relativo a que caracteres empleados para la caracterización y la identificación de otros géneros de hongos filamentosos no son tan útiles para diferenciar las especies de *Trichoderma*, y por ello se requiere el análisis integral de los resultados de la caracterización de las cepas. En este sentido, Rifai (1969) y Bissett (1991a) han destacado las dificultades inherentes en la definición de las especies en cuanto a la morfología. Samuels *et al.* (1996) también proporcionó observaciones detalladas y comentarios sobre la utilidad y limitaciones de caracteres morfológicos para definir las especies en *Trichoderma*. En muchos casos, las variaciones en la morfología no son lo suficientemente precisas para definir las diferencias entre especies (Chaverry y Samuels, 2003; Druzhinina *et al.*, 2006). La introducción de herramientas moleculares ha incrementado el número de especies identificadas (Hoyos y Bisset, 2011).

La amplificación de las regiones del espaciador transcrita interno (ITS) ITS1-5.8S-ITS2 en las diez cepas produjeron un amplicón de aproximadamente 560 pb, lo que concuerda con resultados informados por otros autores que han utilizado los mismos cebadores ITS1 e ITS4 (Chakraborty *et al.*, 2010). Las secuencias consenso obtenidas estuvieron entre 421 y 558 pb (Anexo 2).

La confrontación con las bases de datos produjo para cada cepa homología elevada (97,0-100,0%) con varias especies en cada cepa, lo cual coincidió con informes previos de otros autores que indican que los resultados del uso de cebadores ITS solos en muchos casos no son suficientemente informativos para discernir entre especies muy cercanas filogenéticamente (Hoyos y Bisset, 2011).

Varios autores han destacado la importancia de la identificación de las cepas promisorias como agentes de biocontrol puesto que es el primer paso en los estudios para el desarrollo de bioproductos (Stefanova, 2007; Gupta *et al.*, 2014). Sin embargo, la identificación de especies de *Trichoderma* basada solo en descripciones de sus características fenotípicas o en la secuenciación de regiones ITS del ADN produce resultados no satisfactorios en todos los casos (Błaszczuk *et al.*, 2011). Para dar solución a esta problemática Samuels *et al.* (2006) propusieron la identificación de las especies combinando los resultados de las observaciones de las características culturales, morfológicas y moleculares.

Estos autores recomiendan el uso de claves basadas en caracteres fenotípicos cuando hay dudas derivadas de la similaridad de las secuencias. Este fue el enfoque adoptado en este estudio donde los resultados demostraron la presencia de tres especies: *T. harzianum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai y *T. longibrachiatum* Rifai (Tabla 12). Autores como Kumar y Sharma (2013) también combinaron los resultados de la caracterización morfológica y cultural de cepas de *Trichoderma* con los resultados de la caracterización molecular para su identificación hasta especie.

Tabla 12. Identificación de especies de *Trichoderma* spp. aisladas de suelo y con capacidad antagónica *in vitro* frente a *M. fijiensis*.

Sección	Especie	No. Cepas	Teleomorfo
<i>Trichoderma</i>	<i>T. harzianum</i>	2	<i>Hypocrea lixii</i> Pat. (Chaverri y Samuels, 2002)
<i>Longibrachiatum</i>	<i>T. pseudokoningii</i>	2	<i>Hypocrea pseudokoningii</i> (Samuels et al., 1998)
	<i>T. longibrachiatum</i>	6	<i>Hypocrea orientalis</i> (Druzhinina et al., 2005)

Una descripción de cada especie se muestra a continuación.

***Trichoderma harzianum* Rifai**

Las cepas identificadas como *Trichoderma harzianum*, fueron las correspondientes a los códigos CCECh-p1 y CCECh-M18 (Figura 8).

Las colonias fueron de crecimiento rápido en PDA con abundante esporulación que cubría toda la superficie del medio de cultivo, de textura pulverulenta, micelio aéreo blanquecino con pústulas aplanadas de color verde. El reverso de las colonias varió de blanquecinas a amarillo pálido. Hifas y conidióforos hialinos, paredes lisas, rectos o doblados, ramificados. Las fiálides se observaron ampuliformes constreñidas en la base y los conidios subglobosos de paredes lisas y color verde claro. Clamidosporas solitarias. Homología con secuencias en bases de datos empleadas del 99,0%.

T. harzianum es una de las especies más comúnmente aisladas del suelo (Hoyos-Carvajal et al., 2009; Druzhinina et al., 2010; Błaszczuk et al., 2011). Se asocia a la rizosfera de plantas cultivadas y se emplea frecuentemente como control biológico de hongos fitopatógenos (Chaverri y Samuels, 2004).

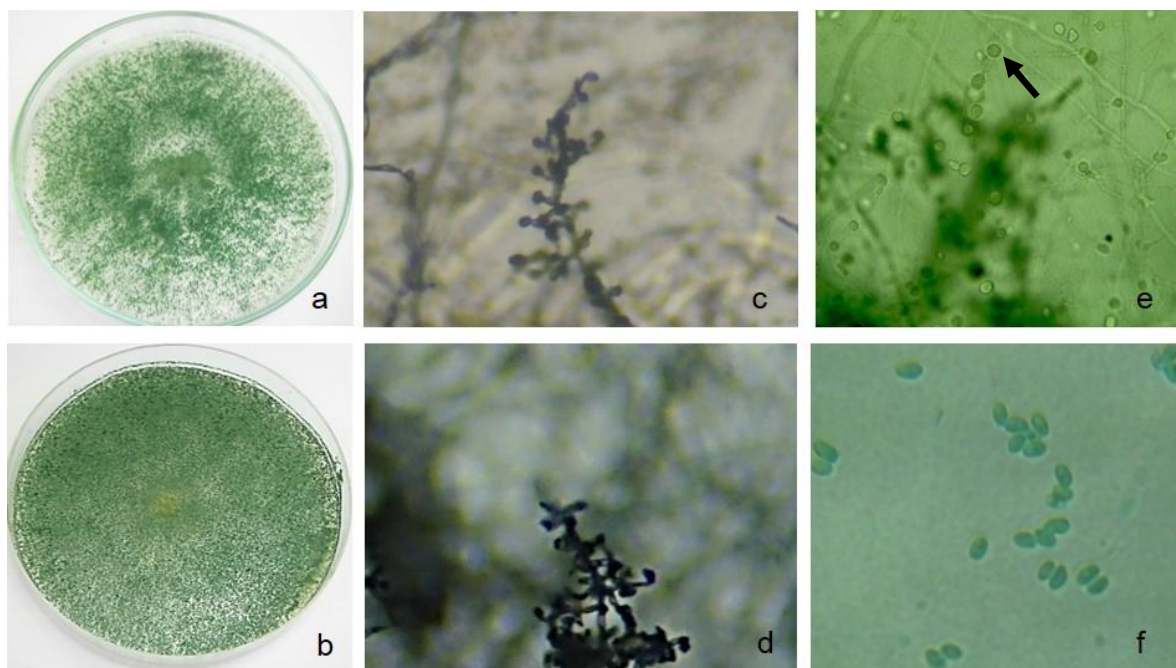


Figura 8. Cepas identificadas como *T. harzianum*. a. CCCh-p1, b. CCCh-M18, c-d. Conidióforos, e. Clamidosporas. f. Conidios. Observaciones microscópicas con aumento de 400x.

***Trichoderma pseudokoningii* Rifai**

Las cepas CCECh-M11 y CCCh-TJM, de acuerdo con sus características morfológicas se identificaron como *T. pseudokoningii* (Figura 9).

Las colonias se caracterizaron por crecimiento rápido en PDA, micelio aéreo blanquecino, con abundante esporulación de una tonalidad verde a verde oscura y reverso blanquecino.

Los conidióforos se observaron hialinos con un eje central largo, rectos, con ramas laterales cortas. Las fiálides estrechas en la base, generalmente individuales. Los conidios fueron cilíndricos, verde azulados, de paredes lisas, unidos en pequeñas cabezas conidiales en el extremo de las fiálides. Homología con secuencias en bases de datos empleadas del 99,0% en CCCh-TJM y del 100% en CCECh-M11.

Se ha informado de la capacidad de cepas de *T. pseudokoningii* de producir sideróforos (Kubicek y Harman, 1998) y como agente de biocontrol. En este sentido, Haggag y Soliman (2011) demostraron la capacidad antagónica de cepas de *T. pseudokoningii* frente a diferentes hongos fitopatógenos *in vitro* y en casa de cultivo. Sin embargo, se ha encontrado ocasionando infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Gautheret *et al.*, 1995) y ello pudiera atentar contra su uso en sistemas agrícolas.

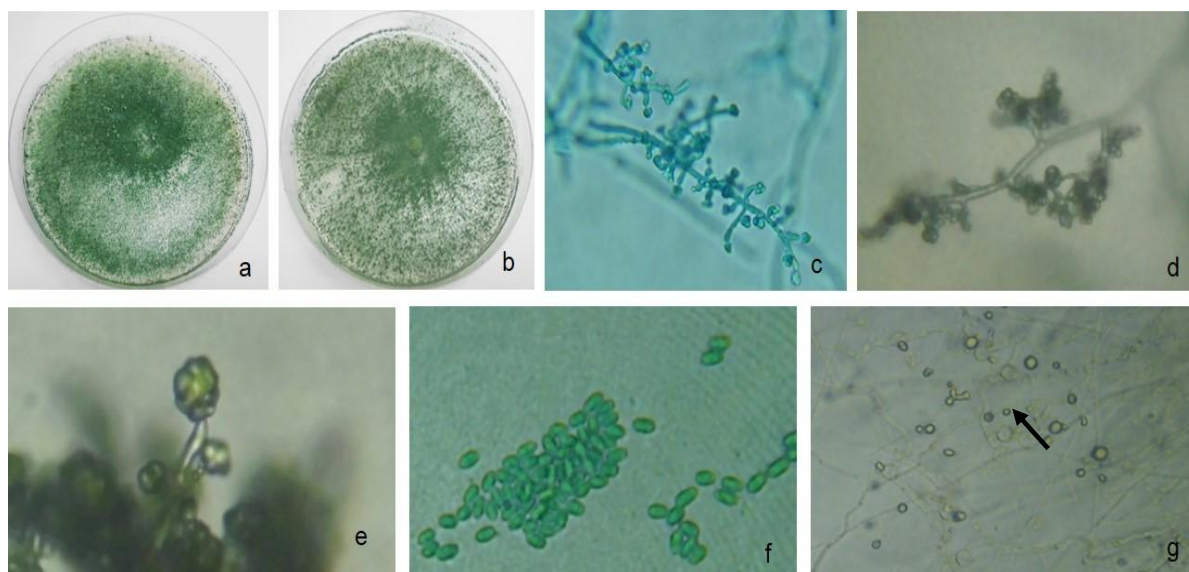


Figura 9. Cepas identificadas como *T. pseudokoningii*. a. CCCh-M11, b. CCCh-TJM, c-e. Conidióforos, f. Conidios, g. Clamidosporas. Observaciones microscópicas con aumento de: c. g. 400x, d, e. 1000x.

***Trichoderma longibrachiatum* Rifai**

Como *T. longibrachiatum* se identificaron seis cepas: CCCh-Tung, CCCh-Ju13, CCCh-Ju27, CCCh-Ca36-3, CCCh-T5, CCCh-THSL (Figura 10).

Las colonias mostraron crecimiento rápido en medio de cultivo PDA con micelio principalmente sumergido, translúcido o blanquecino, reverso verde amarillo y textura flocosa.

Se observaron conidióforos hialinos con ramificación primaria larga y recta, secundarias cortas y generalmente individuales que terminan en una fiálide y forman pústulas en la superficie de la colonia. Las fiálides se disponían solitarias y también intercalares debajo de las fiálides terminales, estrechas en la base. Los conidios tenían forma elipsoidal y color verde claro, lisos, se agruparon en cabezas en el extremo de las fiálides. Clamidosporas presentes intercalares o terminales. Homología con secuencias en bases de datos empleadas del 97,0% en CCCh-T5 y del 99,0% en el resto.

En la literatura científica consultada se encontraron estudios sobre cepas de *T. longibrachiatum* identificadas como productoras de sideróforos (Kubicek y Harman, 1998) y otras empleadas como agentes de biocontrol contra diferentes hongos fitopatógenos (Hermosa *et al.*, 2000; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008; Guijón-López *et al.*, 2010; Haggag y Soliman, 2011). Sin embargo, también se ha informado de su hallazgo en muestras clínicas y como un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos (Chouaki *et al.*, 2002; Kredics *et al.*, 2003), lo cual pudiera limitar su uso agrícola.

Según el criterio de Howell (2003), la capacidad de cepas de *Trichoderma* para actuar como agentes de biocontrol efectivos, es fuertemente influenciada por las características

ecológicas de la región donde se aplican. Sobre este particular, consideró que el aislamiento y uso de cepas nativas como agentes de biocontrol tiene el potencial de proveer un control de la enfermedad en campo más elevado y consistente que las cepas que deben adaptarse al sitio donde posteriormente actuarán como controles biológicos. A partir de lo anterior se seleccionó la cepa CCCh-p1 (*T. harzianum*) para continuar los estudios del desarrollo de un bioproducto que pudiera ser empleado en el manejo de la Sigatoka negra en bananeras orgánicas. Se tuvo en cuenta que se ubicó entre las cepas de mayor velocidad de crecimiento y demostró antagonismo *in vitro* frente a *M. fijiensis* así como que fue aislada de la hacienda donde se planificaron los ensayos de campo. También se tuvieron en cuenta las referencias sobre posibles daños a la salud humana de cepas de las especies *T. longibrachiatum* y *T. pseudokoningii* y por ello se descartaron como potenciales candidatos para el desarrollo de un bioproducto.

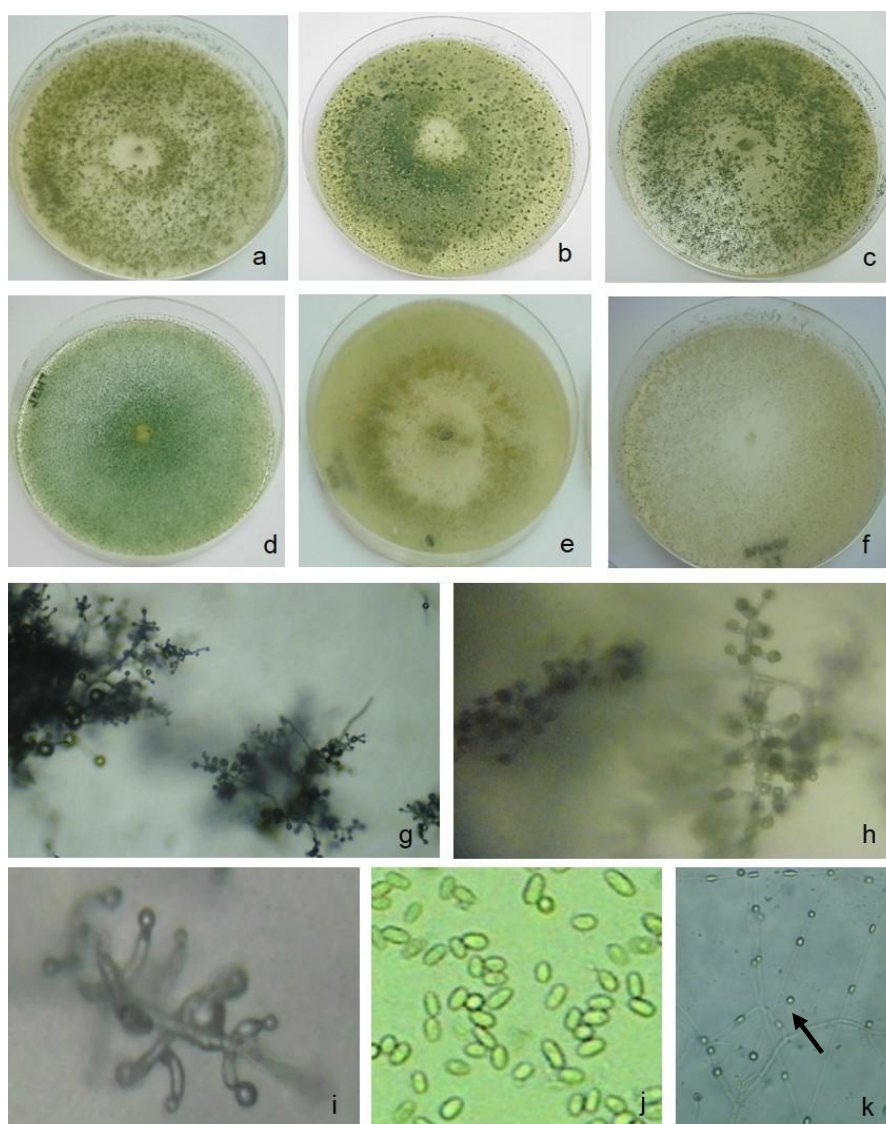


Figura 10. Cepas identificadas como *T. longibrachiatum*. a. CCCh-Ju27, b. CCCh-13, c. CCCh-Ca36-3, d. CCCh-THSL, e. CCCh-Tung, f. CCCh-T5, g-i. Conidióforos, j. Conidios, k. Clamidosporas. Observaciones microscópicas con aumento de: g. 100x, h y k. 400x, i, j. 1000x.

Los resultados de este acápite evidenciaron que mediante la comparación del crecimiento radial en el tiempo de 100 cepas de *Trichoderma* spp. se pudo comprobar la capacidad de estas de crecer en medio de cultivo PDA y se lograron definir dos grupos. En el primero se ubicaron las de mayor velocidad de crecimiento y en el segundo el resto. Del primer grupo se seleccionaron 10 aisladas de suelo de plantaciones bananeras y se comprobó su antagonismo *in vitro* frente a *M. fijiensis* mediante competencia por espacio y nutrientes así como micoparasitismo. Se identificaron tres especies (*T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. pseudokoningii*) mediante un análisis integral de sus caracteres culturales, morfológicos y moleculares. Para continuar los estudios se seleccionó la cepa CCCh-p1 (*T. harzianum*) atendiendo a sus características y a que los ensayos de campo se planificaron en la hacienda donde fue aislada.

4.2 Formulación de bioproducto

4.2.1 Proceso fermentativo

La cepa *T. harzianum* CCCh-p1 se multiplicó sobre el sustrato de arroz, el crecimiento vegetativo fue escaso pero la esporulación fue abundante y produjo conidios tanto en los frascos de vidrio como en el biorreactor (Figura 11).

Los resultados indicaron la posibilidad de obtener elevadas concentraciones de conidios en las condiciones de fermentación ensayadas. Se observaron diferencias significativas entre el número de conidios g⁻¹ de sustrato a los 3 y 6 días de incubación en frascos de vidrio y el biorreactor (Figura 12).

En este último el mayor valor del número de conidios se obtuvo a los 6 días de incubación y fue de $6,3 \times 10^9$ conidios g⁻¹ ($9,8 \log_{10}$), el cual se mantuvo constante hasta el día 21 de evaluación. Sin embargo, a ese mismo tiempo en los frascos de vidrio se obtuvieron $3,18 \times 10^8$ conidios g⁻¹ ($8,5 \log_{10}$). Ello arrojó una diferencia de $5,99 \times 10^9$ de conidios mayor en el biorreactor que en los frascos (Figura 12). Este resultado se relaciona principalmente con el control de parámetros importantes tales como la temperatura, humedad y aireación.

Los resultados en estudio, coinciden con otros autores como Fernández-Larrea y Elosegui (2006), quienes informaron que la multiplicación de *Trichoderma* spp. en sustrato de arroz permitió alcanzar una concentración de $2,0\text{-}3,0 \times 10^8$ conidios mL⁻¹.

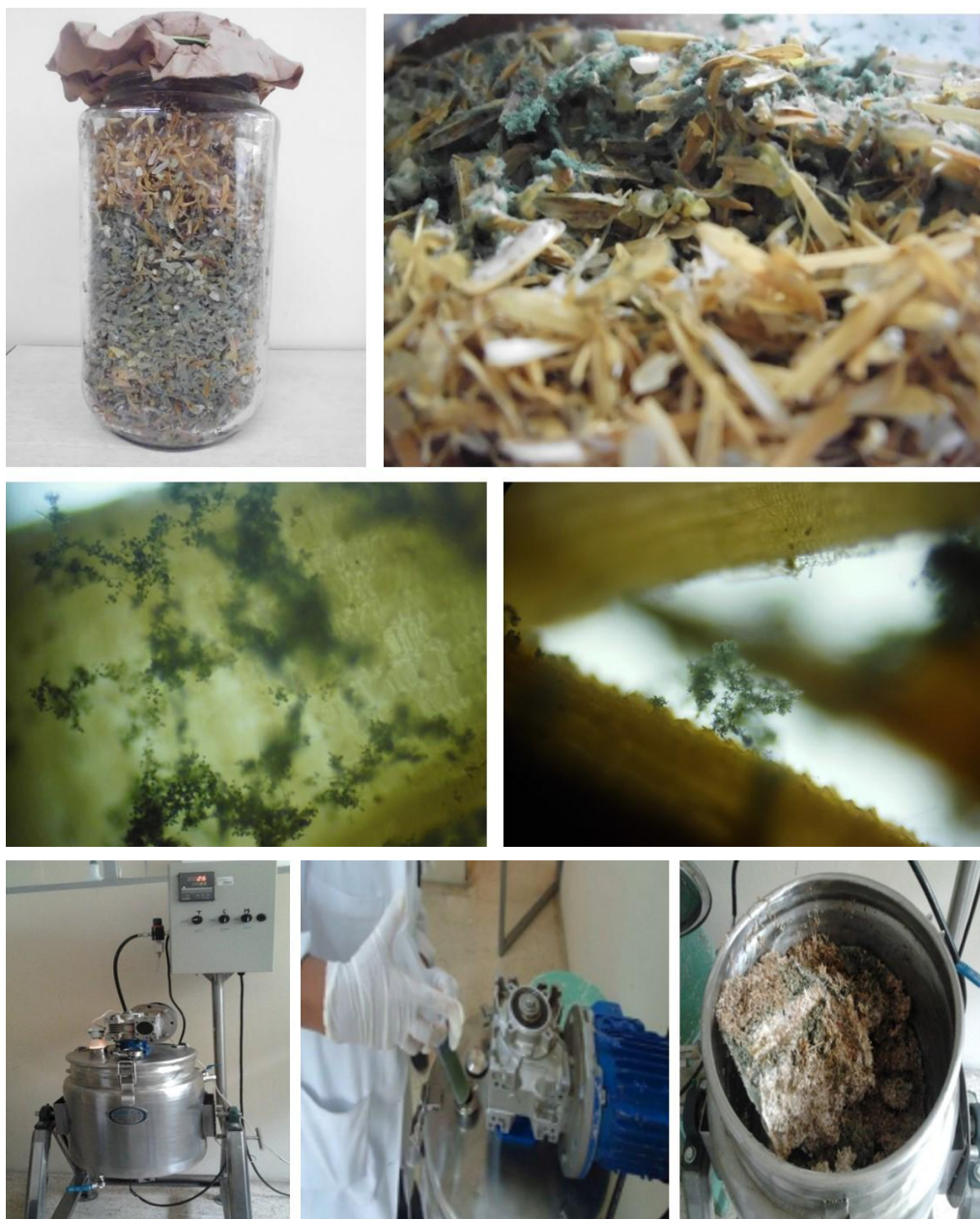


Figura 11. Esporulaci3n de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 en fermentaci3n s3lida sobre sustrato de arroz en frascos de vidrio de 750 mL de capacidad y biorreactor.

La mayor eficiencia del proceso en el biorreactor est3 dada por la reducci3n del tiempo para obtener 10^9 conidios g^{-1} ; el volumen de producto obtenido de una sola vez es de 8,5 kg mientras en un frasco es de 200g. El uso de mano de obra y el n3mero de operaciones necesarias es menor, lo cual contribuye a disminuir tambi3n los costos y los riesgos de contaminaci3n. La presencia de este equipamiento en el laboratorio (construido en la propia universidad como resultado de un trabajo de tesis) (Figura 11) brinda la posibilidad de incrementar los vol3menes de producci3n y responder a una alta demanda productiva en poco tiempo.

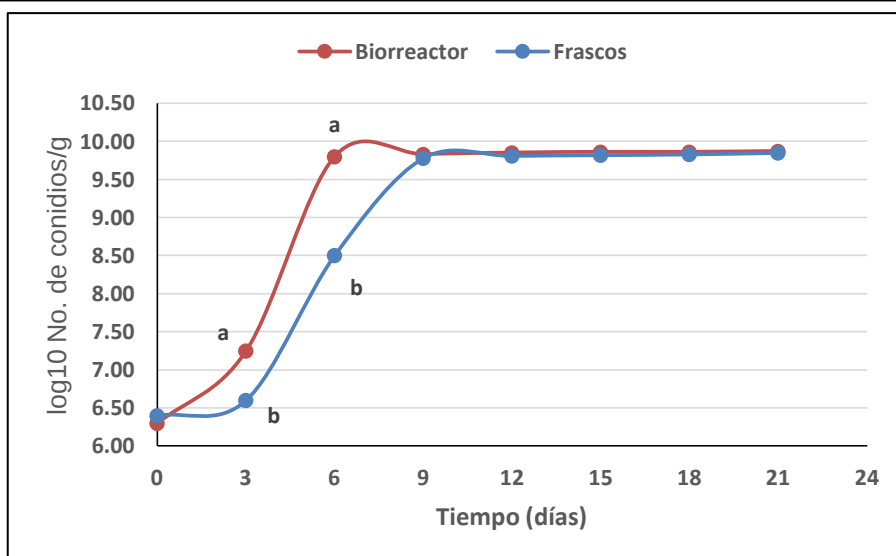


Figura 12. Esporulaci3n de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 en fermentaci3n s3lida sobre sustrato de arroz en frascos de vidrio y en biorreactor. Letras diferentes al mismo tiempo de incubaci3n indican diferencias significativas seg3n la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para $p < 0,05$.

Generalmente en trabajos de casa de cultivo y campo se utiliza al menos una concentraci3n de $1,0 \times 10^8$ esporas mL^{-1} de los bioproductos (Harman *et al.*, 2010). Por ello, es necesario que los procesos fermentativos garanticen la multiplicaci3n del antagonista y la obtenci3n de un elevado n3mero de esporas por gramo de sustrato empleado. El empleo de una m3quina separadora de esporas construida para este fin en la ESPOCH (Cajo y Valladares, 2007) garantiz3 que se obtuviera una formulaci3n de polvo seco, libre de sustrato, con una elevada concentraci3n de conidios de *T. harzianum* CCCh-p1 que puede servir de base al desarrollo de otras formulaciones ($2,5 \times 10^{11}$ conidios g^{-1} ; 11,40 $\log_{10}$). Este resultado se corresponde con lo informado por Fern3ndez-Larrea y El3segui (2006) de valores similares en el orden de 10^{11} conidios g^{-1} de *T. harzianum* colectados de sustratos secos. Es importante considerar que la concentraci3n de esporas que se aplica en el control biol3gico de fitopatógenos cuanto mayor sea, mejores son los resultados (Hjeljord *et al.*, 2003).

4.2.2 Selecci3n de la formulaci3n

4.2.2.1 Eficacia en casa de cultivo

Se comprob3 que la inoculaci3n artificial de *M. fijiensis* CCCh-Mf1 produjo s3ntomas en las plantas de banano cv. 'Williams' similares a los descritos previamente en otros cultivares (Portal *et al.*, 2011; S3nchez-Garc3a *et al.*, 2012) con el empleo del mismo protocolo de inoculaci3n (Leiva-Mora *et al.*, 2010) (Figura 13).



Figura 13. Ensayo en casa de cultivo sobre efecto de dos formulaciones de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 sobre plantas de banana cv. 'William' inoculadas con *M. fijiensis*. a. Plantas en casa de cultivo, b. Inoculación de *M. fijiensis*, c. Aplicación de formulaciones, d. Hoja sin síntomas, e-h. Estado de síntomas del 1 al 4 según escala propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (2003).

El período de incubación fue diferente para cada tratamiento. En el control inoculado los primeros síntomas puntiformes aparecieron en el envés de las hojas a los 14 dpi (días posteriores a la inoculación), mientras que en el tratamiento donde se aplicó la formulación 1 (polvo seco) fue a los 19 dpi. En el tratamiento con la formulación 2 (formulado líquido) los primeros síntomas no se observaron hasta los 54 días posteriores a la inoculación. Esta variable epifitológica ha servido para diferenciar cultivares de *Musa* con respecto a su respuesta frente a *M. fijiensis* en casa de cultivo (Romero y Sutton, 1997; Abadie *et al.*, 2003), pero no se ha referido su uso para evaluar la eficacia de productos biológicos para el manejo de Sigatoka Negra.

De igual forma, se constató una reducción en la frecuencia de aparición de los síntomas en los tratamientos donde se emplearon las formulaciones de *T. harzianum* CCCh-p1 (Figura 14). Con la formulación 1 (polvo seco) predominaron los primeros estados de síntomas (1 y 2) hasta el día 54 después de la inoculación con el patógeno y solo alcanzaron el estado 3 (manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el haz) al final del período a diferencia del control inoculado donde se observó que el patógeno ocasionó síntomas hasta el estado 5 (manchas negras con centros secos grises). En las plantas donde se aplicó la formulación 2 solo se observaron síntomas en estado 1 casi al final del ensayo.

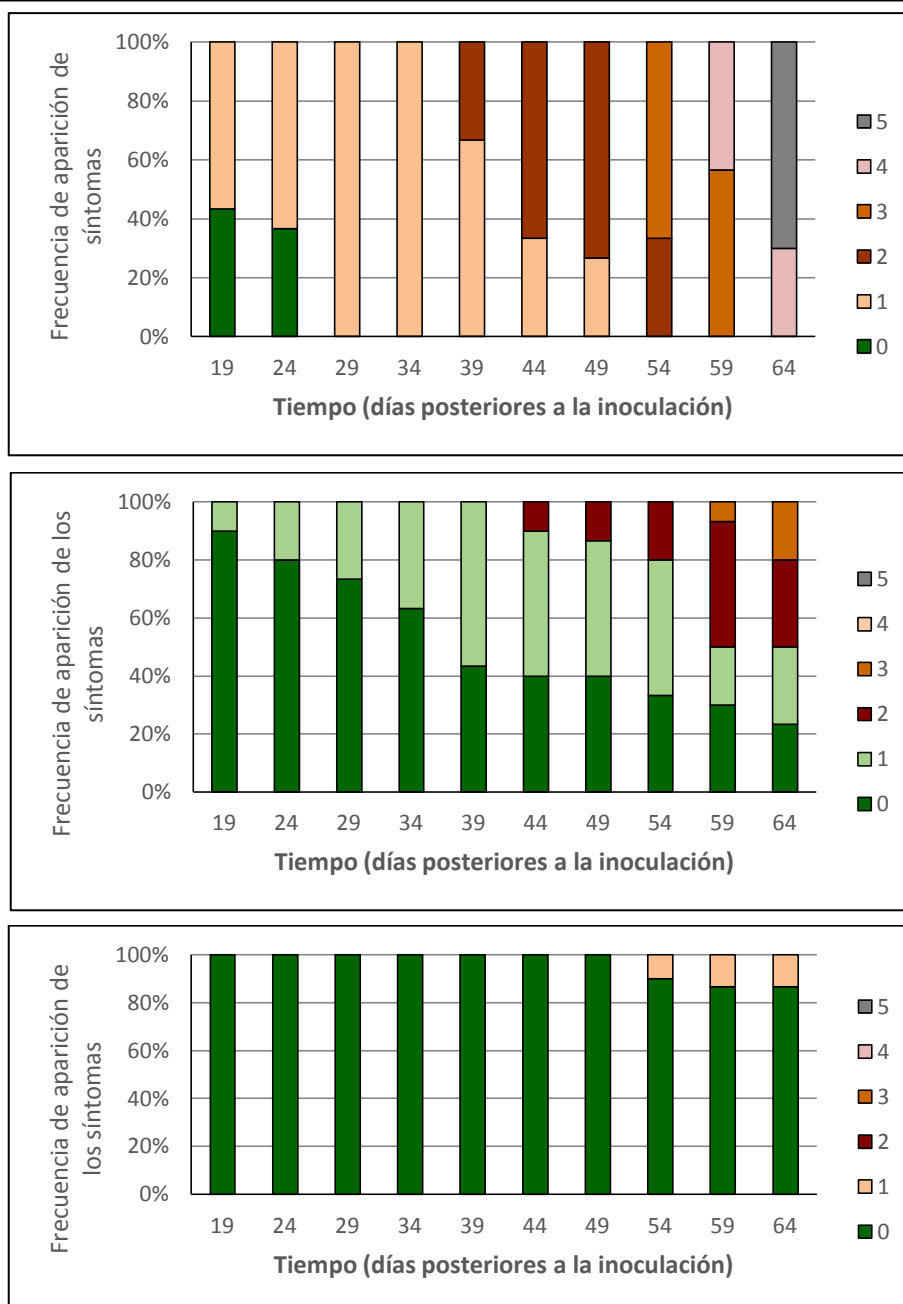


Figura 14. Efecto de la aplicación de formulaciones a base de esporas de *T. harzianum* CCCh-p1 sobre la frecuencia de aparición de síntomas ocasionados por la inoculación artificial de *M. fijiensis* en plantas de banano cv. 'Williams' en casa de cultivo. Arriba: Control, plantas inoculadas con *M. fijiensis*. En el medio: plantas inoculadas con *M. fijiensis* y a las 72h con Formulación 2. Abajo: Plantas inoculadas con *M. fijiensis* y a las 72h con Formulación 1. Estados de síntomas según la escala propuesta por Alvarado-Capó et al. (2003). n=30.

Por otra parte, en los tratamientos con las formulaciones de *T. harzianum* se observó un retraso en la aparición de los estados de síntomas, además, el estado de síntomas promedio en estos tratamientos fue significativamente menor con respecto al control inoculado (Figura 15).

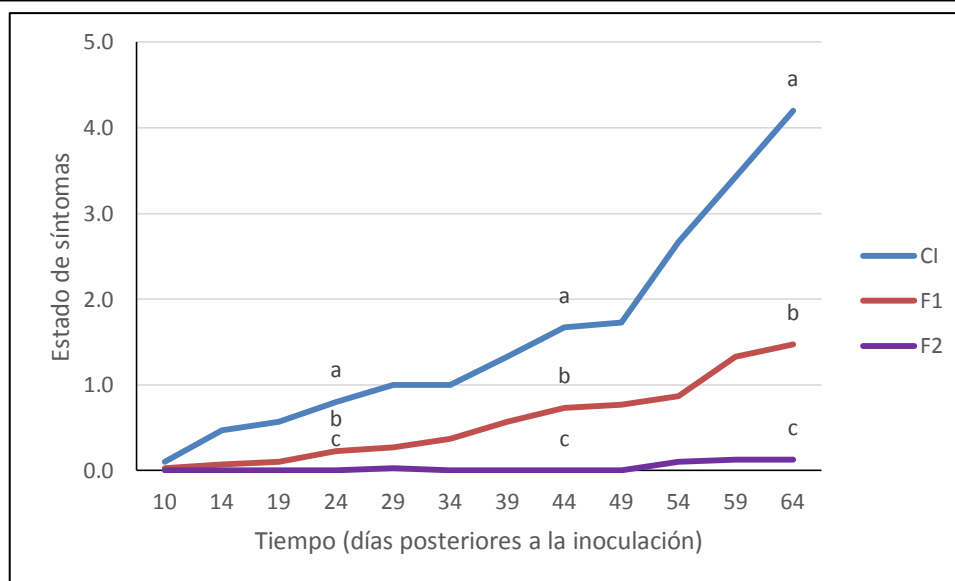


Figura 15. Efecto de la aplicación de formulaciones a base de esporas de *T. harzianum* CCCh-p1 sobre el estado de síntomas ocasionados por la inoculación artificial de *M. fijiensis* en plantas de banano cv. 'Williams' en casa de cultivo. Letras diferentes en cada tiempo, entre los tratamientos, indican diferencias significativas entre las medias según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para $p < 0,05$. Estados de síntomas según la escala propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (2003). $n=30$.

Como otra evidencia de lo anterior, la aplicación foliar de *T. harzianum* tuvo efecto sobre las variables TES (tiempo de evolución de los síntomas) y TDE (tiempo de desarrollo de la enfermedad) en las plantas de banano cv. 'Williams' inoculadas artificialmente con *M. fijiensis*. En las hojas donde se empleó el agente biológico los síntomas no alcanzaron los estados de mancha necrótica (estados 4 y 5 de la escala propuesta). Al término del experimento (64 dpi) cuando las hojas inoculadas con el patógeno tenían síntomas en los estados 4 (hoja con manchas negras elípticas o circulares con bordes cloróticos y halo acuoso. La hoja mantiene tejido verde) y 5 (hoja con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y pueden colgar del pseudotallo) y el TES era de 50 dpi y el TDE de 64 dpi, en las plantas donde se aplicó *Trichoderma* estas variables no pudieron ser calculadas (> 64 dpi) (Tabla 13). Los síntomas no sobrepasaron el estado 3 (manchas de contornos regulares o irregulares de color pardo rojizas por el haz) con la formulación 1 ni el estado 1 (hoja con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz) con la formulación 2. De igual forma, se constató que las formulaciones de *T. harzianum* CCCh-p1 ocasionaron una disminución significativa de las variables Índice de infección, PPI (promedio ponderado de infección), estado de síntomas promedio y ABCPE (área bajo la curva del progreso de la enfermedad) (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto de dos formulaciones de *T. harzianum* CCCh-p1 sobre *M. fijiensis* inoculado artificialmente en plantas de banano cv. 'Williams'.

Tratamiento	TES	TDE	Índice de infección			PPI 64dpi	ESP64 dpi	ABCPE
			24 dpi	44dpi	64 dpi			
Control inoculado	50	64	10,56a	27,78a	78,33a	4,69a	0,13c	1011,20a
Formulación 1	>64	>64	3,33b	11,67b	24,44b	1,46b	1,47b	389,00b
Formulación 2	>64	>64	0,00c	0,00c	2,22c	0,13c	4,20a	46,66c

TES: tiempo de evolución de los síntomas, TDE: tiempo de desarrollo de la enfermedad, PPI: promedio ponderado de infección, ESP: Estado de síntomas promedio según escala propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (2003), ABCPE: área bajo la curva de progreso de la enfermedad, dpi: días posteriores a la inoculación. Las formulaciones se aplicaron tres días después de inoculado el patógeno. Valores con letras diferentes para los tratamientos indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para $p < 0,05$. $n=30$.

Los resultados de este estudio indicaron la capacidad de la cepa nativa (Ecuador) *T. harzianum* CCECH-p1 como antagonista de *M. fijiensis* en casa de cultivo y coincidieron con informes previos de Arzate-Vega *et al.* (2006) quienes evaluaron varias cepas nativas (México) de *Trichoderma* y comprobaron que dos de ellas redujeron la infección ocasionada por *M. fijiensis* en casa de cultivo. Este resultado coincide, además, con referencias positivas de la aplicación de cepas de *Trichoderma* spp. contra enfermedades foliares como las causadas por *Botrytis cinerea* (De Bary) Whetzel (Elad *et al.*, 1993; Elmhirst *et al.*, 2011), *Dresslera triicirepentis* (Perelló *et al.*, 2003) y *Cercospora beticola* Sacc (Galleti *et al.*, 2008).

La eficacia de las formulaciones (considerando la variable índice de infección) a los 64 días posteriores a la inoculación fue del 68,8% para la formulación 1 y de 97,16% en la formulación 2. *M. fijiensis* es un hongo hemibiotrófico que en su proceso de colonización de la hoja de banano antes de penetrar por los estomas crece epifíticamente (Marín *et al.* 2003). Para garantizar la presencia de inóculo de este patógeno se aplicó el antagonista tres días después de inoculado. Los resultados indicaron que ambas formulaciones redujeron significativamente el inóculo presente aunque la disponibilidad adicional de nutrientes en la formulación 2 garantizó una efectividad mayor. En este sentido, Legged *et al.* (2011) mencionaron que la adición de otros componentes, además del ingrediente activo, permite suplir al agente biológico de nutrientes necesarios para su colonización, los protege frente a condiciones ambientales desfavorables e incrementa la eficacia del control. Al respecto, Elad (2000) ha mencionado que además de la actividad antagónica, el control biológico involucra también la capacidad de sobrevivir en el hábitat donde el agente es aplicado. Aunque no se comprobó de forma directa sobre la hoja, los mecanismos de *T. harzianum* contra *M. fijiensis* pudieran estar en correspondencia con lo

obtenido en los ensayos de antagonismo *in vitro* donde se evidenció competencia por espacio y nutrientes y micoparasitismo.

La reducción del PPI ha sido considerado un indicativo de reducción de la severidad de la enfermedad en campo (Hernández *et al.*, 2013). En analogía, esta variable podría evidenciar también la efectividad del antagonista en casa de cultivo donde se obtuvieron valores significativamente menores que el control con la aplicación de las dos formulaciones y también diferencias entre ellas.

Por otra parte, el ABCPE mostró una reducción significativa de la evolución de la enfermedad en presencia del antagonista con diferencias entre las formulaciones. Esta variable se ha empleado para determinar la efectividad de fungicidas en condiciones de campo en el control de enfermedades foliares causadas por especies de *Mycosphaerella* (McGovern *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2006; Burke y Dunne, 2008; Leiva-Mora, 2008).

De igual forma, en la literatura consultada se constató que las variables utilizadas en este ensayo se emplean fundamentalmente para evaluar la resistencia de cultivares de *Musa* spp. a la enfermedad en casa de cultivo y campo (Gauhl, 1994; Twizieyimana *et al.*, 2007; Leiva-Mora, 2008). Sin embargo, en este estudio resultaron útiles para seleccionar una formulación de *T. harzianum* con respecto a su efecto sobre *M. fijiensis* en plantas inoculadas artificialmente.

Lo anterior, unido a que el ensayo en casa de cultivo se realizó con una concentración de inóculo del patógeno controlada, plantas uniformes, condiciones ambientales semicontroladas y la aplicación por una vez de dos formulaciones de *T. harzianum*, con igual concentración pero diferente composición, permitió comprobar el potencial de esta cepa contra el patógeno aunque su efecto debe ser validado en condiciones de campo.

4.2.2.2 Viabilidad de las formulaciones en el tiempo

El estudio de viabilidad permitió comprobar que el tipo de formulación influyó en la viabilidad en el tiempo de los conidios (ingrediente activo de las formulaciones).

El número de conidios se redujo en el tiempo en las dos formulaciones a las tres temperaturas de almacenamiento lo cual coincide con referencias previas que indican esta tendencia en los productos biológicos (Santos *et al.*, 2012).

En la formulación 1 no se encontraron diferencias significativas para el número de conidios g⁻¹ ni para el número de conidios germinados g⁻¹ a las tres temperaturas de almacenamiento para un mismo tiempo de evaluación ($p < 0,05$). Sin embargo, el número de conidios y el número de conidios germinados decreció significativamente desde una concentración inicial de 10¹¹ hasta 10⁹ conidios g⁻¹ a los 60 días a las tres temperaturas (Tabla 14).

Tabla 14. Contenido de conidios en formulación (polvo seco) de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 almacenada a tres temperaturas durante 60 días.

Tiempo (días)	Log ₁₀ No. conidios g ⁻¹			Log ₁₀ No. conidios germinados g ⁻¹		
	4°C	14°C	22°C	4°C	14°C	22°C
0	11,40a (2,5 x 10 ¹¹)	11,40a (2,5 x 10 ¹¹)	11,43a (2,7 x 10 ¹¹)	11,39a (2,48 x 10 ¹¹)	11,43a (2,5 x 10 ¹¹)	11,41a (2,6 x 10 ¹¹)
30	9,44b (2,75 x 10 ⁹)	9,44b (2,75 x 10 ⁹)	9,43b (2,69 x 10 ⁹)	9,41b (2,60 x 10 ⁹)	9,42b (2,62 x 10 ⁹)	9,423b (2,61 x 10 ⁹)
40	9,32b (2,09 x 10 ⁹)	9,32b (2,09 x 10 ⁹)	9,30b (1,98 x 10 ⁹)	9,28b (1,92 x 10 ⁹)	9,30b (1,98 x 10 ⁹)	9,31b (2,04 x 10 ⁹)
60	9,18c (1,51 x 10 ⁹)	9,18c (1,51 x 10 ⁹)	9,19c (1,56 x 10 ⁹)	9,13c (1,36 x 10 ⁹)	9,14c (1,39 x 10 ⁹)	9,12c (1,34 x 10 ⁹)

Valores con letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para p<0,05.

La viabilidad (Tabla 15) disminuyó con el tiempo, de 99,0% a 90,0%, pero se mantuvo constante en las tres temperaturas ensayadas. El tiempo máximo de consumo se estimó en un año (356 días).

Tabla 15. Viabilidad de formulación de polvo seco (formulación 1) de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 en almacenamiento a diferentes temperaturas.

Tiempo (días)	Viabilidad (%)			Ecuación de la curva ajustada*			Estimación TMC (días)		
	4°C	14°C	22°C	4°C	14°C	22°C	4°C	14°C	22°C
0	99,0	99,0	99,0	y = -	y = -	y = -	356	356	356
30	95,0	95,0	95,0	0,0087x +	0,0193x +	0,0157x +			
40	92,0	92,0	92,0	9,7033	10,093	9,5783			
60	90,0	90,0	90,0	R ² = 0,998	R ² = 0,9984	R ² = 0,9927			

*Regresión lineal. TMC: tiempo máximo de consumo

En la formulación 2 (formulado líquido) el número de conidios mL⁻¹ se redujo significativamente en el tiempo con el incremento de la temperatura (Figura 16). De la misma manera, esta variable en los tres tratamientos tuvo una tendencia a decrecer desde 10⁹ a los 8 días hasta 10⁴ a los 60 días (~de 9 a 4 log₁₀ conidios mL⁻¹). El número de conidios germinados fue mayor a partir de los 40 días cuando se mantuvo la formulación a 4°C con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 16).

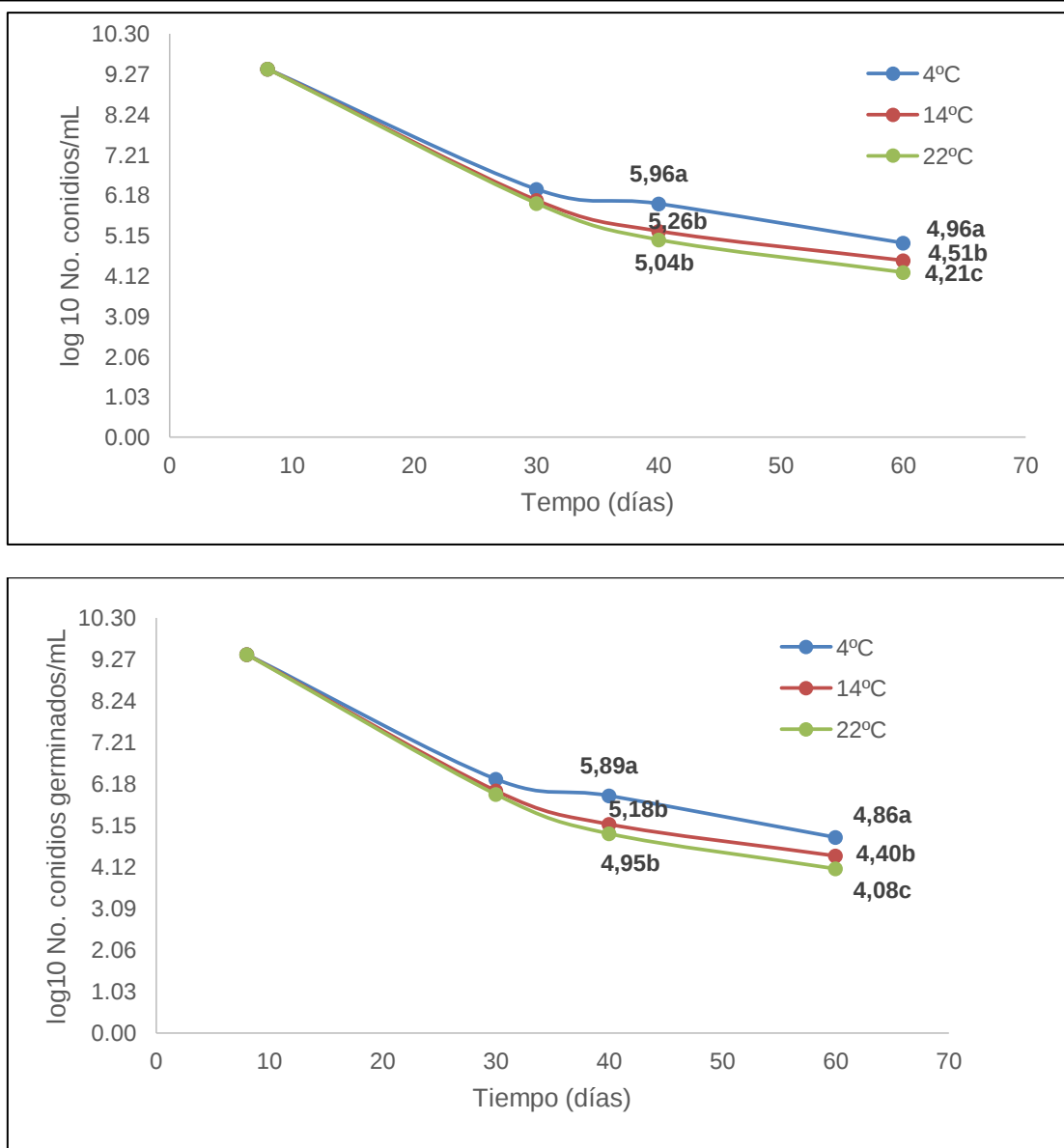


Figura 16. Contenido de conidios mL^{-1} en formulación 2 (formulado líquido) conservada a diferentes temperaturas hasta los 60 días. Arriba: No. de conidios mL^{-1} . Abajo: No. de conidios germinados. Valores con letras diferentes en cada tiempo de evaluación indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Whitney para $p < 0.05$.

La viabilidad de los conidios en esta formulación, a partir de los 40 días, fue menor al 85,0% (Tabla 16). Se ha considerado que la viabilidad o proporción de conidios vivos disminuye con el tiempo, esto depende de las condiciones en las cuales son almacenados. Esta prueba debe ser realizada al momento de la extracción y formulación del material, a diferentes intervalos de tiempo durante el período de almacenamiento y antes de ser usado. De hecho, diferentes factores nutricionales y factores ambientales como la temperatura, luz y pH afectan la viabilidad, germinación, crecimiento vegetativo y esporulación (Harman *et al.*, 2010). En este sentido, las formulaciones líquidas

generalmente garantizan períodos menores de viabilidad de los conidios con respecto a otros tipos de formulaciones con menor contenido de humedad (Santos *et al.*, 2012).

Tabla 16. Viabilidad de formulación líquida (formulado líquido) de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 en almacenamiento a diferentes temperaturas.

Tiempo (días)	Viabilidad (%)			Ecuación de la curva ajustada*			Estimación TMC (días)		
	4°C	14°C	22°C	4°C	14°C	22°C	4°C	14°C	22°C
0	99,0	99,0	99,0	y = -	y = -	y = -	40	40	35
30	94,0	92,0	90,0	0,4024x +	0,4362x +	0,4779x +			
40	85,0	84,0	81,0	103,13	103,05	102,74			
60	79,0	77,0	75,0	R ² = 0,9434	R ² = 0,9743	R ² = 0,9688			

*Regresión lineal. TMC: tiempo máximo de consumo con una viabilidad del 85,0%.

Estos resultados difieren de los obtenidos por otros autores que informan la viabilidad de bioproductos a base de *Trichoderma* entre 6 meses y un año y medio pero con diferentes formulaciones y métodos de conservación a las implicadas en este ensayo (Santos *et al.*, 2012). Para esta formulación en dependencia de la temperatura, el tiempo máximo de consumo con una viabilidad del 85,0% se encontraba entre 35 y 40 días. Ello podría limitar su producción en grandes volúmenes para mantenerlo almacenado por tiempos superiores. Sin embargo, su efecto negativo estaría en dependencia de las estrategias de producción y comercialización que se adopten ya que puede ser preparada a partir de la formulación 1 solo con la adición de los adyuvantes. No obstante, se requieren otros estudios que permitan incrementar la viabilidad de esta formulación en el tiempo. Dicha problemática es común a muchos sistemas de producción artesanal de bioproductos y se convierte en un reto a vencer.

El estándar recomendado para la utilización de hongos como agentes de control biológico es de una viabilidad mayor del 80,0% (Berlanga-Padilla, 2006). Incluso, autores como Jenkins y Grzywacz (2000) y Santos *et al.* (2012) consideran 85,0% como un límite de viabilidad mínima que deben tener los bioplaguicidas fúngicos para garantizar su calidad y eficacia. Aunque se prefieren altas concentraciones de conidios viables, estas últimas variables dependen también de un número mayor de factores que deben ser tenidos en cuenta, entre los que sobresale el sitio de aplicación (suelo o foliar), el tipo y características del patógeno que se desea controlar, el tipo de interacción con *Trichoderma*, así como la propia composición de la formulación y las condiciones medioambientales del sitio donde se aplique (Adekunle *et al.*, 2001; Kolombet *et al.*, 2007).

En este estudio se corroboraron resultados de otros autores que han indicado que la temperatura de almacenamiento también puede influir en el tiempo máximo de consumo

o vida útil del bioproducto (tiempo al cual el bioproducto posea 85,0% de viabilidad). En general, las temperaturas bajas favorecen la viabilidad y las altas la limitan debido fundamentalmente a la actividad del metabolismo microbiano y a la presencia de metabolitos tóxicos que pueden acumularse (Papavizas, 1985).

Los resultados de este acápite indicaron que es posible propagar *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 sobre sustrato de arroz y obtener una elevada concentración de conidios g^{-1} (10^9) en seis días de cultivo, tanto en frascos de cultivo de 750,0 mL de capacidad (200g) como en un biorreactor (8,5 kg). En este último se logra un volumen de producción mayor en menor tiempo. Como resultado de esta fermentación sólida se obtuvo una formulación de polvo seco ($2,5 \times 10^{11}$ conidios g^{-1}) y otra líquida. Se comprobó el potencial de dichas formulaciones para controlar a *M. fijiensis* en casa de cultivo. Según Andrews (1992) el principal requisito que debe cumplir una formulación es que se mantenga viable el agente de control biológico durante el mayor tiempo posible en el almacenamiento, y sobre todo que funcione bien cuando se aplique. Los resultados de este acápite evidenciaron que las dos formulaciones permiten mantener la viabilidad de los conidios de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1, pero teniendo en cuenta que la formulación 2 (formulado líquido) garantizó una mayor efectividad (97,16%) en casa de cultivo, se seleccionó para el ensayo en campo.

4.3 Validación del potencial de biocontrol

4.3.1 Ensayo de eficacia en campo

A través del ensayo realizado se comprobó que *T. harzianum* CCCh-p1 en una formulación líquida (formulación 2) tuvo efecto sobre el índice de infección por Sigatoka negra en plantas naturalmente infectadas (Tabla 17) y que este se relacionó con la dosis de aplicación.

Tabla 17. Efecto de la aplicación de la formulación líquida de *T. harzianum* CCCh-p1 sobre el índice de infección a Sigatoka negra en plantas de banano cv. 'Williams' en campo.

Tratamiento	Índice de infección (meses previos a floración)				
	1	2	3	4	5
Químico	7,0 d	7,1 d	6,1 d	5,0 d	4,1 d
Control	11,1 a	10,5 a	10,3 a	11,1 a	10,8 a
BF2 ($1,0 \text{ Lha}^{-1}$)	10,3 a	10,6 a	9,0 b	9,6 b	9,3 b
BF2 ($2,0 \text{ Lha}^{-1}$)	9,6 b	9,8 b	9,0 b	9,8 b	9,1 b
BF2 ($3,0 \text{ Lha}^{-1}$)	10,5 a	10,0 b	9,5 b	9,6 b	9,0 b
BF2 ($4,0 \text{ Lha}^{-1}$)	8,8 c	9,6 b	8,8 bc	9,3 b	9,2 b
BF2 ($5,0 \text{ Lha}^{-1}$)	9,1 c	9,0 c	8,6 c	8,3 c	8,3 c

Medias seguidas de letras diferentes en una columna indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Witney para $p < 0,05$. BF2 bioproducto en formulación 2 (formulado líquido).

La mayor eficacia en el control de la enfermedad se obtuvo con la dosis de 5,0 L ha⁻¹ con valores entre 14,2 y 25,2%, aproximadamente la mitad de la eficacia del control químico. Sobre la base de estos resultados se seleccionó la dosis de 5,0 L ha⁻¹ para evaluar su efecto durante dos ciclos de cultivo.

La formulación líquida del bioproducto de *T. harzianum* (formulación 2) aplicada sobre hojas de plantas de banano cv. 'Williams' produjo un efecto estimulante en la fase de crecimiento vegetativo de las plantas. La altura fue superior en todas las evaluaciones así como el área foliar a los tres meses de cultivo. En el resto de las evaluaciones, los valores de esta variable fueron significativamente superiores al control y no se diferenciaron del tratamiento químico (Tabla 18). En la figura 17 se muestran detalles del ensayo hasta la obtención de la fruta.



Figura 17. Ensayo en campo para evaluar el efecto de una formulación líquida de *T. harzianum* CCCh-p1 en el control de la Sigatoka negra.

Tabla 18. Efecto de la aplicación del bioproducto de *T. harzianum* CCCh-p1 (5,0 L ha⁻¹) en dos ciclos de cultivo de plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA) en una finca de producción orgánica.

Variable	Tratamiento	Primer ciclo			Segundo ciclo		
		Tres meses	Seis meses	Floración	Tres meses	Seis meses	Floración
Altura (m)	Control	1,13 b	1,58 b	2,04 b	0,81c	1,54 b	1,86 c
	Bioproducto	1,36 a	1,83 a	2,20 a	1,12 a	1,77 a	2,11 a
	Químico	1,28 b	1,64 b	2,12 ab	0,91 b	1,68 b	2,09 b
No. hojas	Control	5,40 b	7,28 b	7,43 c	5,67 b	7,03 b	7,47 c
	Bioproducto	6,11 a	8,63 b	8,63 b	5,90 a	7,10 b	9,70 b
	Químico	6,13 a	9,97 a	10,66 a	5,93 a	9,73 a	11,53 a
Área foliar (m ²)	Control	0,56 b	3,34 b	4,07 c	0,52 c	3,29 b	4,62 c
	Bioproducto	1,26 a	4,20 a	6,62 b	1,22 a	4,14 a	7,11 b
	Químico	0,56 b	4,47 a	7,92 a	0,71 b	4,43 a	8,35 a

Medias seguidas de letras diferentes en cada columna para cada variable indican diferencias entre los rangos según la prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney ($p < 0,05$) $n=30$.

En la floración, otras variables relacionadas con la severidad de la enfermedad tales como la hoja más joven con síntomas, la hoja más joven manchada, el promedio ponderado de infección y el índice de infección en el tratamiento con la formulación líquida mostraron diferencias significativas con respecto al control con valores superiores, pero menores que en el tratamiento químico en ambos ciclos de cultivo (Tabla 19). La eficacia del bioproducto calculada con los resultados del índice de infección fue de 18,0% para el primer ciclo y 24,6% para el segundo mientras que en el control químico fue de 35,6% en el primero y 60,4% en el segundo.

Tabla 19. Efecto de la aplicación de bioproducto de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 (5,0 L ha⁻¹) sobre la severidad de la Sigatoka negra en plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA). Datos tomados a la floración.

Tratam.	Variables							
	Hoja más joven con síntomas		Hoja más joven manchada		Promedio Ponderado de Infección		Índice de Infección	
	IC	IIC	IC	IIC	IC	IIC	IC	IIC
Control	5,86 c	5,93 c	6,63 c	6,63 c	0,65 a	0,62 a	10,83 a	10,39 a
Bioproducto	7,03 b	7,40 b	7,90 b	7,50 b	0,53 b	0,47 b	8,89 b	7,83 b
Químico	8,83 a	10,20 a	10,40 a	10,40 a	0,42 c	0,25 c	7,00 c	4,11 c

Medias seguidas de letras diferentes en cada columna para cada variable indican diferencias entre los rangos según la prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney ($p < 0,05$) $n=30$. IC: primer ciclo, IIC: Segundo ciclo.

El análisis de los resultados en la cosecha reveló que la enfermedad tuvo un efecto perjudicial en la fisiología de las plantas no tratadas y el rendimiento se redujo (Tabla 20). Estas plantas tuvieron menor número de hojas y área foliar, el período de tiempo desde la floración a la cosecha se incrementó y la primera hoja de la planta mostraba síntomas de la enfermedad. Todo ello condujo a una reducción significativa del peso del racimo, el número de manos y la longitud y diámetro de los dedos.

En esta fase del cultivo también se evidenció el efecto bioestimulante y antagonista de *T. harzianum* CCCh-p1 aplicado en una formulación líquida por aspersión foliar. Relacionado con esto, el número de hojas, el área foliar, el número de manos, el diámetro del dedo del centro, el peso neto de la fruta y la relación caja/racimo fueron significativamente superiores al control. En el resto de las variables relacionadas con el rendimiento no se observaron diferencias significativas con el tratamiento químico. Las variables hoja más joven con síntomas, hoja más joven manchada, PPI e índice de infección mostraron diferencias significativas tanto con el control como con el tratamiento químico (Tabla 20).

Los resultados de este ensayo en condiciones de campo demostraron que la aplicación foliar del bioproducto en formulación líquida incrementó el crecimiento de las plantas,

también que el enfoque adoptado es capaz de reducir la severidad de la enfermedad y los efectos negativos de la enfermedad en el rendimiento de las plantas.

Trichoderma es el hongo más ampliamente usado como biocontrol (Harman y Shores, 2007). Su efecto beneficioso sobre las plantas y el suelo ha sido bien documentado en publicaciones científicas.

Tabla 20. Efecto de la aplicación de bioproducto de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 (5,0 L ha⁻¹) a la cosecha de plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa AAA*) en el segundo ciclo de cultivo.

Variables	Tratamiento		
	Control	Bioproducto	Químico
No. hojas por planta	1,32 c	2,73 b	7,13 a
Area foliar (m ²)	0,92 c	2,06 b	5,30 a
No. semanas de floración a cosecha	12,17 a	11,77 b	11,80 b
HMJS	1,03 c	2,23 b	6,20 a
HMJM	1,03 c	2,53 b	6,87 a
PPI	1,29 a	0,78 b	0,37 c
Índice de infección	21,50 a	13,00 b	6,16 c
No. manos por racimo	3,27b	4,77 a	5,03 a
Masa fresca del racimo (kg)	7,29 b	14,49 a	14,16 a
Masa fresca del raquis (kg)	1,83 b	2,59 a	2,41 a
Diámetro del dedo del centro de la segunda mano (mm)	40,40 a	41,80 a	43,57 a
Diámetro del dedo del centro de la última mano (mm)	38,53 b	39,77 a	41,00 a
Longitud del dedo del centro de la segunda mano (cm)	20,36 b	21,45 a	21,45 a
Longitud del dedo del centro de la última mano (cm)	19,04 b	20,25 a	19,93 a
Peso neto de la fruta (g)	5,46 c	9,97 b	11,74 a
Relación caja/racimo	0,29 c	0,52 b	0,62 a

Medias seguidas de letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas entre los rangos según la prueba de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney ($p < 0,05$) $n=30$. HMJS: hoja más joven con síntomas, HMJM: hoja más joven manchada, PPI: Promedio ponderado de infección.

Se han propuesto algunos mecanismos que pueden explicar la promoción del crecimiento vegetal por *Trichoderma*. Entre ellos se ha mencionado la inducción de resistencia, el incremento en la absorción de nutrientes y el uso más eficiente de macronutrientes, micronutrientes y agua (Harman y Shores, 2007; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Generalmente, la relación simbiótica se ha descrito cuando *Trichoderma* se aplica al suelo o directamente a la semilla. Los resultados de este trabajo sugieren la capacidad bioestimulante de este bioproducto en aplicación foliar, pero se requieren otros estudios que permitan identificar los mecanismos involucrados en la promoción del crecimiento de las plantas en condiciones de campo.

Se conoce que en las plantas tienen lugar complejas y diversas interacciones bióticas; sin embargo, los valores de las variables HMJS, HMJM, PPI e índice de infección en el tratamiento que incluyó la aplicación de la formulación líquida indicaron cierto grado de control por la reducción de inóculo y la severidad de la enfermedad. Todas estas

variables emplean como datos primarios la estimación de la severidad de la enfermedad basada en la escala de Stover (Stover, 1976) modificada por Gaulh (1990) que proporciona información sobre la cantidad de tejido infectado de la hoja. En plantas de este tratamiento comparado con el control los valores fueron significativamente menores, aunque su eficacia no se equiparó con el tratamiento químico. Por otra parte, el PPI es un valor de referencia de la incidencia y severidad de la enfermedad en la plantación. Si el PPI es elevado, la severidad también (Orozco-Santos *et al.*, 2013). En ambos ciclos de cultivo, el PPI en el tratamiento con la formulación del bioproducto fue significativamente menor que en el control a la floración y a la cosecha. En adición a esto, el análisis de las variables HMJS y HMJM mostró un menor progreso de la enfermedad en hojas jóvenes en dicho tratamiento.

Anteriormente, Villalta y Guzmán (2008) habían probado la aplicación de una cepa de *Trichoderma* (suspensión de esporas en agua) para el control de la Sigatoka negra en alternancia con microorganismos eficientes y fungicidas, pero los resultados fueron negativos. En este ensayo la formulación de *Trichoderma* que se aplicó por aspersión foliar incluyó componentes adicionales (adyuvantes) para facilitar la colonización en la hoja. Estos resultados estuvieron en correspondencia con los alcanzados en casa de cultivo con respecto a la formulación elaborada solo con una suspensión acuosa de conidios del antagonista donde se demostró que la adición de nutrientes a la formulación incrementó la eficacia del bioproducto. Los conidios del hongo se aplican con garantía de una fuente de nutrientes segura en un ambiente hostil dada la intensidad de la competencia. Para las aplicaciones foliares esto es muy importante, pues la capacidad para competir es esencial para el establecimiento del antagonista. Por otra parte, el empleo de los componentes por el antagonista para su nutrición permite su degradación lo cual es favorable pues disminuye el riesgo de residuos en los frutos y puede ser utilizado hasta poco tiempo antes de la cosecha. Como características adicionales de este bioproducto se puede mencionar que los sustratos y adyuvantes son de bajo costo, se puede preparar al momento de la solicitud del cliente a partir de la formulación en polvo seco que puede conservarse por mayor tiempo, y puede ser aplicado directamente a las plantas mediante aspersores manuales o avionetas.

Por otra parte, como se ha descrito anteriormente por Galletti *et al.* (2008), la aplicación foliar de *Trichoderma* puede tener como efecto adicional el incremento de su presencia en el suelo y contribuir a la reducción de inóculo en restos de cosecha o desechos de las labores culturales. En el caso del banano, los restos de plantas, hojas, frecuentemente se acumulan entre surcos de plantas. La capacidad de esporulación de *M. fijiensis* en tejido foliar de plantas de banano depositado en el suelo ha sido informado por Villalta y

Guzmán (2005). Sin embargo, nuevos estudios serían necesarios para demostrar esta hipótesis de la reducción de inóculo por la aplicación de esta formulación.

Uno de los objetivos de muchas prácticas en la producción orgánica de banano es la reducción de la presión de inóculo en el campo (Pérez, 2013). La formulación líquida de *T. harzianum* empleada en este estudio contribuye a este propósito y podría ser usada en alternancia, combinación o sustitución de otros compuestos con efecto fungicida que a los bananeros orgánicos les está permitido usar (muchos de ellos importados) si se comprueba su compatibilidad.

Especies de *Trichoderma* han sido aisladas de diferentes sustratos, incluyendo plantas de *Musa*. Por ejemplo, Pocasangre *et al.* (2000) aislaron *Trichoderma* sp. del cilindro central de plantas. Por otra parte, Alvindia y Natsuaki (2008) encontraron *Trichoderma harzianum* (cepa DGA01) en frutos de banano y Xia *et al.* (2011) como endofito y epifito asociado a raíces de banano. La presencia natural de este antagonista en plantas de *Musa* spp. pudiera ser un indicativo de su capacidad de colonizar estos nichos ecológicos y su potencial para el control de patógenos. La cepa empleada para elaborar la formulación fue aislada de la rizosfera de plantas de *Musa* cv. 'Williams' y posee características de rápido crecimiento *in vitro* y abundante esporulación. La aplicación foliar de la formulación del bioproducto (10^9 conidios L⁻¹), por la superficie abaxial de la hoja, varias veces en el ciclo de cultivo podría permitir la colonización epifítica de nuevas hojas con una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* antagonista de *M. fijiensis* por competencia y micoparasitismo. La diseminación de conidios por el aire podría contribuir a mantener altos niveles de inóculo del antagonista en la plantación.

Los resultados de este ensayo en campo fueron consistentes con los obtenidos *in vitro* y en casa de cultivo de un efecto directo del antagonista sobre el patógeno.

Algunos microorganismos se han empleado en estudios para el control biológico de la Sigatoka negra, principalmente bacterias (Jiménez *et al.*, 1987; Ceballos *et al.*, 2012; Cruz-Martín *et al.*, 2012). Sin embargo, en campo mostraron muy poco control con resultados inconsistentes (Marín *et al.*, 2003; Guzmán *et al.*, 2013). Este es el primer informe de resultados positivos en este sentido.

Este estudio mostró el potencial de una formulación líquida de *T. harzianum*, para el manejo de la Sigatoka negra en una finca de agricultura orgánica situada en la costa del Pacífico de Ecuador. El enfoque propuesto podría formar parte del esquema de manejo integrado de la enfermedad, ya que disminuye su severidad y estimula el crecimiento de las plantas.

4.3.2 Análisis económico

Los resultados del análisis de costos de producción (Tabla 21) para cada uno de los tratamientos, permitieron establecer que el tratamiento control tuvo los menores costos aunque también la menor producción con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Contrariamente, el tratamiento con la formulación del bioproducto alcanzó los mayores costos de producción y el mayor rendimiento en cajas.

Tabla 21. Rendimiento total y costos de producción en ensayo en campo sobre efecto de una formulación líquida de *T. harzianum* CCCh-p1 sobre el control de la Sigatoka negra en plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA) en campo.

Tratamientos	RENDIMIENTO (cajas/ha/semana)	Total de costos de producción (USD)
Control	434,50 c	1070,07 c
Bioproducto	903,76 a	3341,44 a
Químico	834,24 b	2366,46 b

Medias con letras diferentes en una columna indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Withney para $p < 0,05$.

El análisis de Presupuesto Parcial, para cada uno de los tratamientos que se realizó en base a la proyección del rendimiento obtenido a través de la relación caja/racimos (Tabla 22) y el total de costos que varían para cada tratamiento (TCV) arrojó que el beneficio bruto, los costos variables y el beneficio neto fueron significativamente superiores en el tratamiento donde se aplicó el antagonista (Tabla 22).

Tabla 22. Análisis de beneficios por tratamiento en ensayo en campo sobre efecto de una formulación líquida de *T. harzianum* CCCh-p1 sobre el control de la Sigatoka negra en plantas de banano cv. 'Williams' (*Musa* AAA) en campo.

Tratamientos	Beneficio bruto* (\$)	Costos variables (\$)	Beneficio neto (\$)
Control	1738,00 c	1070,07 c	667,93 c
Bioproducto	8133,84 a	3341,44 a	4792,40 a
Químico	3336,96 b	2366,46 b	970,50 b

*($\$9$ caja de banano orgánico) Medias con letras diferentes en una columna indican diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis/Mann Withney para $p < 0,05$.

A pesar de que la aplicación del bioproducto fue el tratamiento más productivo y requiere altos costos de producción, también dejó los mejores beneficios (réditos) económicos (Tabla 22) dados por el precio del banano orgánico que supera al de los obtenidos por métodos convencionales.

Una vez determinados los beneficios netos parciales, para cada tecnología, cuando estas se clasificaron y se ordenaron de menor a mayor, sobre la base de los costos variables con sus respectivos beneficios netos, el análisis de dominancia para los tratamientos en estudio estableció que los tres fueron no dominados (ND). Esto se relaciona con presentar una mínima inversión para su aplicación (Control) y un beneficio neto satisfactorio (químico y bioproducto) a medida que los costos de inversión se incrementaron.

Dentro de los tratamientos no dominados se observó que el químico y el bioproducto obtuvieron una tasa de retorno marginal (TRM) con diferencias entre ellas de 125,47% (Tabla 23). Con este resultado se confirma que el tratamiento con el bioproducto es el de mayor rentabilidad en comparación con los otros dos y se puede considerar la mejor alternativa para el productor de banano en esta investigación, ya que espera recobrar por cada dólar invertido 1,48 USD adicionales.

Tabla 23. Tasa de retorno marginal para los tratamientos no dominados.

Tratamientos	Beneficio neto	Costos variables	Incremento Beneficio Neto	Incremento Costo variable	TRM (%)
Control	667,93	1070,07	-	-	-
Químico	970,50	2366,46	302,57	1296,39	23,34
Bioproducto	4792,40	3341,44	1450,96	974,98	148,81

4.3.3 Compatibilidad con productos empleados en bananeras orgánicas

Se comprobó la compatibilidad de *T. harzianum* CCCh-p1 con el 61,1% de los productos ensayados (Tabla 24). De estos, el 63,3% fueron fungicidas. Estos resultados evidenciaron la factibilidad del uso combinado de este agente de biocontrol con otros productos comúnmente empleados en la producción bananera, principalmente orgánica y la necesidad de alternarlo con los que no presentó compatibilidad. Todo ello dentro de un programa de manejo integrado de la enfermedad.

Papavizas (1985) describió la toxicidad de fungicidas del grupo de los benzimidazoles, sobre *Trichoderma* spp. Especialmente, Benomyl inhibió el crecimiento en cultivo *in vitro* aún a concentraciones menores de 0,5 mg L⁻¹, lo cual está en correspondencia con los resultados obtenidos en este estudio (Figura 18).

De igual forma, se constató que si bien no tuvo compatibilidad con el aceite agrícola (Figura 18) de amplio uso en las bananeras en el manejo de la Sigatoka negra (Guzmán *et al.*, 2013) sí lo fue con otros productos de base oleosa; principalmente de origen

vegetal y con acción fungicida (Tagushi, 3B112, Biopalma, Oilpalma) que permitiría su uso combinado.

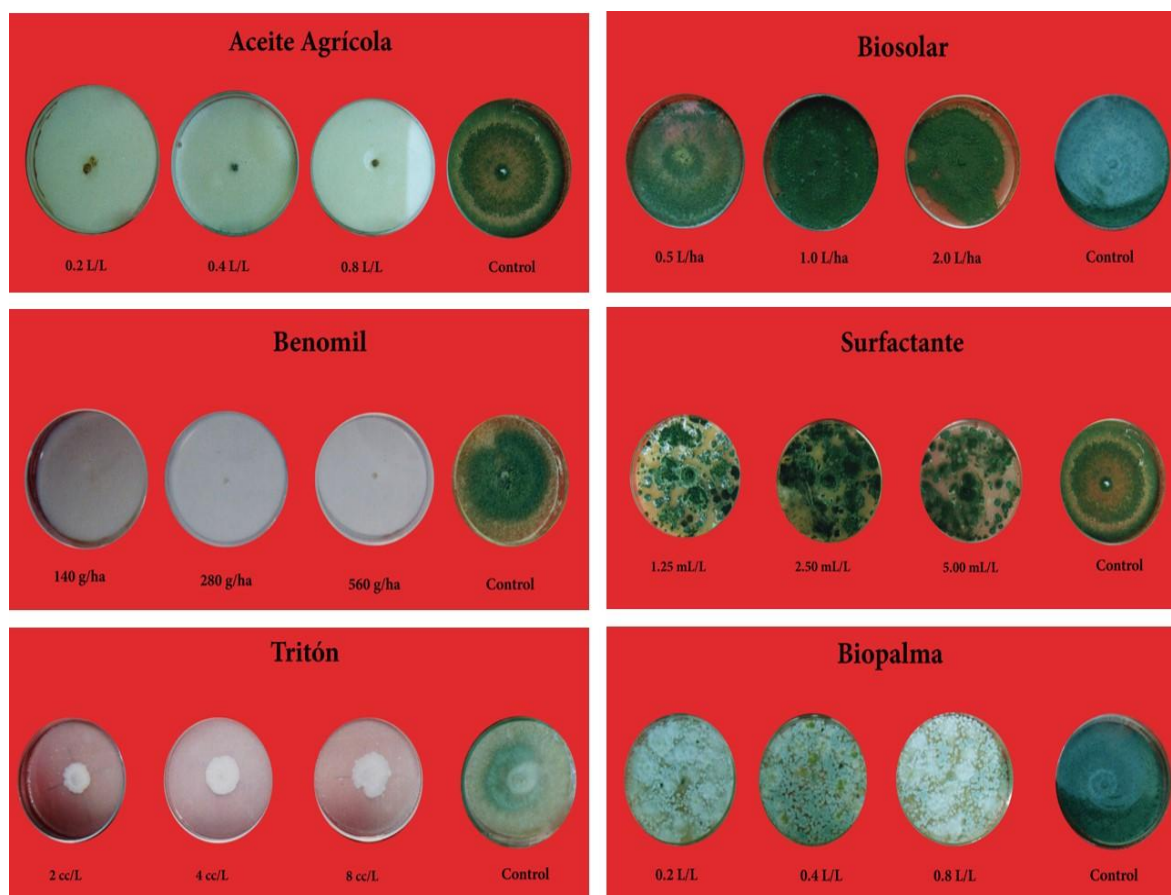


Figura 18. Compatibilidad de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 con otros productos empleados para la protección de plantas.

La compatibilidad de *Trichoderma* con plaguicidas ha sido informada también por otros autores (Latone *et al.*, 1997; Sriniva y Ramakrishnam, 2002; Muiño *et al.*, 2006). En este sentido, Woo *et al.* (2014) apuntaron que la versatilidad de *Trichoderma* se extiende, además de su adaptabilidad a diferentes entornos ecológicos o situaciones agrícolas, a su compatibilidad con productos comúnmente empleados en la protección de los cultivos y con otros agentes de biocontrol y a su sinergismo con muchos pesticidas químicos y otros compuestos naturales lo cual permite una reducción en las dosis normalmente usadas en campo cuando se incluye en los programas de manejo integrado.

Tabla 24. Compatibilidad de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 con productos fungicidas, estimulantes foliares y un fijador.

Nombre comercial	Tipo	Ecuación de la curva ajustada	DL 50	Dosis casa comercial	Compatib.
Mil-agro	FUNGICIDA	$y = -23,143x + 41,2$ $R^2 = 0,9892$	$0,91 \text{ L ha}^{-1}$	$0,80 \text{ L ha}^{-1}$	+
Kaligreen	FUNGICIDA	$y = -15,2x + 24,8$ $R^2 = 0,466$	$0,30 \text{ kg ha}^{-1}$	$1,00 \text{ kg ha}^{-1}$	-
Kripton	FUNGICIDA	$y = -12,857x + 38$ $R^2 = 0,7872$	$1,30 \text{ mL L}^{-1}$	$0,80 \text{ mL L}^{-1}$	+
Tagushi	FUNGICIDA	$y = -0,0443x + 40$ $R^2 = 1$	$395,00 \text{ mL ha}^{-1}$	$200,00 \text{ mL ha}^{-1}$	+
3B112	FUNGICIDA	$y = -0,0311x + 39,2$ $R^2 = 0,6914$	$569,10 \text{ mL ha}^{-1}$	$200,00 \text{ mL ha}^{-1}$	+
Cupront	FUNGICIDA	$y = -16x + 43$ $R^2 = 0,9825$	$1,28 \text{ mL L}^{-1}$	$1,00 \text{ mL L}^{-1}$	+
Tritón	FUNGICIDA	$y = -4,2429x + 30,6$ $R^2 = 1$	$1,91 \text{ mL L}^{-1}$	$4,00 \text{ mL L}^{-1}$	-
Aceite agrícola	FUNGICIDA	$y = -43x + 27,8$ $R^2 = 1$	$0,12 \text{ L L}^{-1}$	$0,40 \text{ L L}^{-1}$	-
Benomyl	FUNGICIDA	$y = -0,06x + 27,2$ $R^2 = 1$	$78,33 \text{ g ha}^{-1}$	$280,00 \text{ g ha}^{-1}$	-
Tilt	FUNGICIDA	$y = -43x + 27,8$ $R^2 = 1$	$0,12 \text{ L ha}^{-1}$	$0,40 \text{ L ha}^{-1}$	-
Biopalma	FUNGICIDA	$y = -2,4286x + 43,6$ $R^2 = 1$	$8,89 \text{ L L}^{-1}$	$0,40 \text{ L L}^{-1}$	+
Oilpalma	FUNGICIDA	$y = -3,7143x + 44,8$ $R^2 = 0,9657$	$6,00 \text{ L L}^{-1}$	$0,40 \text{ L L}^{-1}$	+
Preparación a+b	FUNGICIDA	$y = -12,3x + 30,7$ $R^2 = 1$	$94,05 \text{ mL L}^{-1} + 6,00 \text{ L L}^{-1} + 38,50 \text{ mL L}^{-1}$	$2,50 \text{ mL L}^{-1} + 0,40 \text{ L L}^{-1} + 26,40 \text{ mL L}^{-1}$	-
Surfactante	FIJADOR	$y = -0,2286x + 43$ $R^2 = 1$	$94,05 \text{ mL L}^{-1}$	$2,50 \text{ mL L}^{-1}$	+
Ángel	ESTIM. FOLIAR Y FUNGICIDA	$y = -0,6147x + 45,2$ $R^2 = 0,9699$	$38,50 \text{ L}^{-1}$	$26,40 \text{ mL L}^{-1}$	+
Katabión	ESTIM. FOLIAR	$y = -1,1752x + 32,6$ $R^2 = 0,6626$	$8,59 \text{ mL L}^{-1}$	$15,90 \text{ mL L}^{-1}$	-
Biosolar	ESTIMULANTE FOLIAR	$y = 0,1714x + 42,6$ $R^2 = 1$	$123,10 \text{ L ha}^{-1}$	$1,00 \text{ L ha}^{-1}$	+
Bioestimul.	ESTIMULANTE FOLIAR	$y = -0,5714x + 43$ $R^2 = 0,7143$	$37,62 \text{ L ha}^{-1}$	$1,00 \text{ L ha}^{-1}$	+

Los ensayos para la validación del potencial de biocontrol corroboraron en campo los resultados obtenidos con la formulación líquida de *T. harzianum* CCCh-p1 en casa de cultivo para el control de la enfermedad. La dosis de 5,0 L ha⁻¹ mostró los mayores valores de eficacia, medido como una reducción del índice de infección en las plantas tratadas. Además, se constató un efecto estimulante del crecimiento de este bioproducto sobre las plantas tanto en la fase de crecimiento vegetativo como en la cosecha. El análisis económico estableció la factibilidad del uso de este bioproducto ya que los beneficios netos que se obtienen y la tasa de retorno marginal fueron superiores al tratamiento químico. Esto se favorece por el precio del banano orgánico. Además, se comprobó la compatibilidad de la cepa con la mayoría de los productos incluidos en el estudio que se emplean para la protección de las plantas de banano. Estos resultados permiten proponer la inclusión de este bioproducto en los esquemas de manejo integrado de la enfermedad.

4.4. Sistema de control de la calidad y registro del bioproducto

4.4.1 Control de la calidad

A partir del análisis del flujo productivo previsto (Anexo 3) se identificaron factores que influyen en la calidad del proceso y del producto final y que se agruparon en variables genéticas, sanitarias, microbiológicas, físicas y químicas (Tabla 25).

Como puntos críticos del proceso productivo para garantizar la calidad final del producto se definieron:

- Selección y conservación de la cepa de *Trichoderma harzianum*
- Antagonismo *in vitro* frente a *M. fijiensis*
- Preparación de materiales
- Contaminación ambiental
- Pureza, concentración y viabilidad del inóculo y del bioproducto
- Condiciones de cultivo y de almacenamiento

Sobre esta base se propusieron 25 puntos de control (Tabla 26). Cada punto de control del sistema incluyó una descripción general de las operaciones, el tipo de control, variables a controlar, procedimiento de control y medidas. Por ejemplo:

Punto 6. Control visual del deterioro de envases y empaques.

Descripción: Se inspeccionarán visualmente los envases y empaques para detectar roturas.

Tipo de control: muestreo 100,0%

Variables a controlar:

- Integridad de envases y empaques

Procedimiento de control: revisar el 100,0% de los envases y empaques antes de su utilización. Buscar la presencia de indicios de rotura en la estructura, bordes o tapas.

Método de control: autocontrol

Responsable: personal técnico

Medidas: separar los envases y empaques dañados, marcarlos con etiqueta que indique no utilizar y colocarlos en el depósito de reciclaje.

Otros autores también han considerado importantes en la calidad del producto final aspectos tales como la viabilidad de los conidios, pureza y contenido de humedad (Andrews, 1992; Elósegui, 2006).

Tabla 25. Variables y factores que influyen en la calidad del proceso de producción de bioproducto de *T. harzianum* CCCh-p1.

Variables	Factores		Aspectos que contempla
	en el proceso	en el producto final	
Genética	Cepa de <i>T. harzianum</i>	Cepa de <i>T. harzianum</i>	- Caracteres morfológicos y culturales reconocibles para la especie - Caracterización molecular - Origen - Procedimiento de trabajo para la selección
Sanitarias	- Impurezas en el sustrato - Microorganismos en el ambiente - Desinfección área de trabajo - Desinfección materiales	- Deterioro envases - Deterioro empaques - Microorganismos presentes en ambiente	- Procedimiento de trabajo para separación de impurezas - Asepsia ambiental - Procedimiento trabajo evitar contaminación microbiana
Microbiol.	- Viabilidad y pureza de la cepa - Viabilidad y pureza en sustrato sólido - Concentración de esporas inicial sustrato - Concentración de esporas final sustrato	- Viabilidad y pureza del bioproducto - Concentración de conidios en el bioproducto - Antagonismo <i>in vitro</i> frente a <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	- Procedimiento placa pobre para capacidad germinación de esporas. - Procedimiento para conteo esporas en cámara de Neubauer - Procedimiento para cultivo dual en placa y en microcultivos.
Físicas	- Porcentaje de humedad de sustrato base - Porcentaje de humedad del sustrato inoculado - Temperatura durante el crecimiento	- Temperatura de almacenamiento	- Procedimiento para determinar la humedad y temperatura mediante el termómetro con higrómetro
Químicas	- Calidad del agua - pH del sustrato base	- pH del bioproducto	- Procedimiento de trabajo para determinar la calidad del agua - Procedimiento de trabajo para determinar pH con el uso de peachímetro

Tabla 26. Puntos de control para garantizar la calidad del proceso de producción de bioproducto a base de esporas de *T. harzianum* CCCh-p1.

No. del punto de control	Denominación del punto	Área donde se ejecuta
1	Formulación y preparación de medios de cultivo	Cámara de inoculación
2	Control visual de impurezas de la cascarilla	Pre-mezcla
3	Porcentaje de humedad del sustrato	Pre-mezcla
4	Eliminación de residuos en los recipientes de cultivo utilizados en el proceso productivo	Limpieza y desinfección
5	Lavado y esterilización de recipientes de cultivo, tapas y tubos de ensayo	Limpieza y desinfección
6	Control visual del deterioro de envases y empaques	Esterilización y homogenización
7	Monitoreo ambiental de presencia de microorganismos	Producción/Almacén/cepario
8	Grado de antagonismo frente a <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Cámara de inoculación
9	Pureza y porcentaje de viabilidad del inóculo	Cámara de inoculación
10	Preparación de suspensiones madre	Cámara de inoculación
11	Concentración de conidios del sustrato inoculado inicial	Incubación
12	Concentración inicial de ufc g ⁻¹ del sustrato inoculado	Incubación
13	Control de la temperatura y humedad durante el crecimiento	Incubación
14	Concentración final de conidios del sustrato inoculado	Almacenaje sustrato sólido
15	Concentración final de ufc g ⁻¹ del sustrato inoculado	Almacenaje sustrato sólido
16	Pureza y porcentaje viabilidad y sustrato inoculado final	Almacenaje sustrato sólido
17	Concentración de conidios del polvo seco	Almacenaje polvo seco
18	Concentración de conidios g ⁻¹ del polvo seco	Almacenaje polvo seco
19	Pureza y porcentaje de viabilidad del polvo seco	Almacenaje polvo seco
20	Monitoreo ambiental de la presencia de microorganismos	Producción
21	Calidad del agua	Producción
22	Control del pH del bioformulado líquido	Producción
23	Concentración de conidios del bioformulado líquido	Producción
24	Concentración de ufc g ⁻¹ del bioformulado líquido	Producción
25	Pureza y porcentaje viabilidad del bioformulado líquido	Almacenaje del bioformulado líquido

Se establecieron las buenas prácticas de producción que se detallan a continuación.

Las buenas prácticas de producción son un conjunto de prácticas y procedimientos preventivos, con aplicación en toda la cadena de producción, que incluye: materias

primas, diseño de equipos y edificios, procedimientos de producción, condiciones de manipulación, almacenamiento y transporte del producto, procedimientos de seguridad y limpieza e higiene personal. Con su cumplimiento se garantiza la calidad y asepsia del bioproducto.

Las buenas prácticas de manufactura que el personal debe seguir son:

1. Higiene del personal

- El personal debe lavar sus manos antes de empezar su trabajo y después de ir al baño y/o cambiar de actividad.
- Tener uñas cortadas, limpias y libres de pinturas.
- Tomar un baño diario.
- Tener buena higiene personal.
- No utilizar maquillaje en exceso.
- No utilizar joyas ni accesorios.
- Utilizar adecuadamente los baños, cuidar de su limpieza y orden.

2. Bioseguridad. Uso de equipo de protección individual

- El uso de equipos de protección individual es obligatorio para todos los operarios.
- Cubrir el cabello con cofia.
- Utilizar mascarilla desechable para la elaboración del sustrato sólido.
- Utilizar mascarilla contra polvo para la elaboración del polvo seco.
- Utilizar guantes de látex para la etapa de inoculación y preparación del inóculo.
- Utilizar guantes de caucho para la preparación del bioformulado líquido.
- Usar botas de caucho antideslizante.
- Usar overol de trabajo el cual debe estar siempre limpio durante la producción.
- Usar batas de laboratorio durante la preparación de inóculos.
- Utilizar gafas de protección.

3. Limpieza de las áreas de trabajo

La limpieza consiste en eliminar los materiales de desecho y el lavado de superficies con agua y usualmente un agente limpiador para desplazar la suciedad. Luego de la limpieza se debe desinfectar y secar las áreas antes de empezar el trabajo; es importante pese a realizar una limpieza húmeda mantener las áreas secas.

El ciclo de limpieza es manual:

- Uso de agua y un agente limpiador con fricción y cepillado para remover las partículas de suciedad
- Enjuagar con abundante agua
- Desinfectar
- Secar

4. Buenas prácticas durante el proceso de producción

4.1 Registro de datos en cada lote de producción

4.2 Dentro de las áreas de la fabricación no se permite:

- Consumir alimentos
- Consumir bebidas
- Fumar
- Masticar chicle y/o caramelos

4.3 Si se rompe algún envase de vidrio:

- Recoger los residuos y eliminarlos con cuidado en el área destinada a los basureros.
- No recuperar la materia prima contenida en ellos.
- Si cayeron fragmentos de vidrio sobre materia prima separarla, bloquearla, e informar al coordinador del proceso y calidad para su evaluación.
- Reportar el incidente donde el coordinador de producción.

5. Evitar la presencia de cuerpos extraños

Durante el proceso de producción es importante evitar la presencia de cuerpos extraños. Si se pierde durante el trabajo algún objeto personal, herramienta de trabajo o de limpieza se debe parar la línea para buscarlo y comunicar inmediatamente al coordinador del proceso, retirar o separar el producto para inspección.

Para evitar presencia de cuerpos extraños en la línea de producción se debe:

- Colocar todas las piezas correspondientes en los equipos durante y después de mantenimiento o limpieza.
- Retirar las piezas o partes dañadas después de cualquier arreglo o cambio.
- Retirar las herramientas utilizadas después de cualquier trabajo.
- Verificar el estado de los equipos y ajustar las partes móviles.
- Al utilizar estilete o cuchillos para cortar etiquetas, papeles o cintas de sellado debe evitar que estos se conviertan en objetos extraños y/o contaminantes.

6. Uso apropiado de utensilios

- Los baldes o jarras utilizadas en las áreas de proceso para colocar o dosificar materias primas son de color verde, estos no deben ser utilizados para limpieza de equipos, áreas o para colocar cualquier otro producto.
- Las gavetas sirven para almacenar producto, retrabajo, semielaborado o materias primas de una forma higiénica. Para que esto se cumpla no se debe usar para otros productos, así se evita la contaminación cruzada y la presencia de cuerpos extraños.

7. Sellado de producto

Para garantizar un sellado adecuado, y así conservar la calidad del producto se debe:

- Realizar el sellado por inducción correctamente.
- Colocar tapas y sellos de seguridad.
- Colocar la fajilla de seguridad utilizando la temperatura adecuada, para garantizar el termo sellado.

Se deberá evitar:

- Explosión de botellas al encartonarlas por exceso de aire en el interior.
- Sellado débil, generalmente por falta de presión en el cierre.
- Desprendimiento de la fajilla por temperatura inadecuada o por manipulación errónea.

El operador debe revisar las botellas antes de empacar.

8. Codificación

Las botellas del bioformulado líquido y del polvo seco deben llevar impresa la codificación:

- Número de lote
- Fecha de fabricación
- Fecha de expiración: Mes y año

9. Almacenamiento

La temperatura de almacenamiento del sustrato sólido y del bioformulado líquido debe ser 4°C. El almacenamiento del polvo seco debe ser en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente.

10. Sistema implantado en la cadena de distribución

En el ingreso de materias primas a la bodega se da una identificación mediante un número de tarjeta a cada una de los componentes. Para la transferencia a producción, se debe llevar físicamente el mismo número y registrar en las planillas de producción.

Esta información se une en el área de empaque con el código lote que tiene cada producto.

11. Estados de calidad

Se distinguen de la siguiente manera:

Color amarillo: Materiales (materias primas y embalaje)

Color verde: Producto terminado

Pendiente: indica que el material o producto terminado se encuentra en proceso de análisis, y por lo tanto NO puede ser despachado ni utilizado.

Liberado: indica que el material o producto terminado se encuentra dentro de la norma, y por lo tanto puede ser despachado

Bloqueado: indica que el material o producto presenta alguna desviación, y por lo tanto NO puede ser despachado ni utilizado.

12. Trabajos de mantenimiento

Los programas de mantenimiento de maquinarias y equipos se realizan semestralmente, con personal capacitado, para ello se suspenden las actividades de producción y se consideran las siguientes reglas:

- No dejar piezas sueltas sobre los equipos, colocarlos en su lugar, si están dañadas retirar y desechar correctamente.
- Debemos evitar que los papeles de las etiquetas, cintas de embalaje y otros residuos se transformen en cuerpos extraños.

13. Manejo de desechos

Los materiales de desechos se colocarán en el basurero dentro de fundas negras de basura, jamás debe dejar los desechos dentro del área de trabajo.

- Si el basurero o contenedor está dañado se debe llevar al área asignada para reparación.
- Evitar desorden en el manejo de residuos, así se evitará contaminación.
- El residuo de sustrato sólido será recolectado y enviado al vivero para su reutilización.

14. Retrabajo

Es todo el producto (formulado líquido) con desviación de calidad, es decir, cuando la concentración ha disminuido de su concentración estándar ($\sim 2,5 \times 10^9$ conidios mL⁻¹), por lo tanto, no está apto para su venta. El retrabajo será identificado con etiquetas adhesivas de color amarillo en la que se indique la fecha de producción y el número de lote.

Mediante el sistema de control diseñado se abarcó el proceso de producción y el producto final con el interés de garantizar su calidad. Al respecto Elósegue (2006) señaló que un producto con especificaciones bien definidas y con los consiguientes procedimientos de control de calidad asegura su buen funcionamiento y su seguridad, promueve la estandarización de los costos de producción y garantiza su estabilidad en el mercado, lo que conlleva a la ganancia de confianza en el consumidor. En el caso de los productos a base de hongos su funcionamiento no confiable por falta de calidad ha limitado su éxito en países en desarrollo donde estos requerimientos son mínimos o no existen.

4.4.2 Elaboración de documentación para el registro del bioproducto

A partir de los resultados de este trabajo y la presentación del expediente correspondiente se obtuvo el registro del bioproducto de *T. harzianum* CCCh-p1. El nombre de la marca seleccionado fue TRIKOFUN y la etiqueta aparece en la figura 19.



Figura 19. Etiqueta de bioproducto de *T. harzianum* CCCh-p1.

El número de registro del Ministerio de Agricultura y Ganadería asignado fue el 020611018 y los principales aspectos contenidos en su expediente fueron los que se detallan más adelante.

SECCIÓN I

Datos generales de las HDS:

a) Fecha de elaboración: 01-07-2008

b) Fecha de actualización: 01-07-2012

c) Nombre o razón social de quien elabora la HDS:

MIKROBEN (Microorganismos Benéficos) del Departamento de Fitopatología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

d) Datos generales del fabricante:

MIKROBEN (Microorganismos Benéficos) del Departamento de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

País: Ecuador

Provincia: Chimborazo

Ciudad: Riobamba.

Dirección: Panamericana Sur km 1 1/2

Telefax: 032333033

Celular: 0993200657

E-MAIL: rcastro@esPOCH.edu.ec

e) A dónde comunicarse en caso de emergencia

Dra. Marcia Pesántez Celular: 093200657.

SECCIÓN II

II.1 Datos del bioproducto líquido:

a) Nombre ingrediente activo: *Trichoderma harzianum*

b) Nombre comercial; TRIKOFUN

c) Registro MAG: 020611018

d) Nombre Común: Inoculante del suelo y foliar

e) Tipo de sustancia: microorganismo

f) Sinónimos; SPOROPLANT, TRICHOFIN.

Otros datos relevantes: La capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos, previa comprobación de su efectividad.

II.2 Acción Fitosanitaria: TRIKOFUN contiene una cepa antagonista natural selectiva de *Trichoderma harzianum* que controla a *Mycosphaerella fijiensis* y otros hongos fitopatógenos aislados de cultivos de hortalizas, frutales, flores y ornamentales.

II.3 Aplicación: La aplicación de TRIKOFUN se puede realizar con los métodos convencionales de aspersión, al follaje; se recomienda que el agua tenga un pH entre 5,5-7,0 y la adición de un dispersante.

II. 4 Composición Final: Sustrato líquido con conidios de *T. harzianum*.

II. 5 Dosis: 1,0 a 5,0 litros ha⁻¹.

II. 6 Concentración: 2,5 x 10⁹ conidios mL⁻¹ de producto

SECCIÓN III

Identificación de la sustancia:

III.1 Clasificación de los grados de riesgo:

- a) a la salud: No es tóxico a los humanos (pruebas toxicológicas)
- b) de inflamabilidad: NULO
- c) de reactividad: NULO

SECCIÓN IV

IV. 1 Propiedades físicas y químicas del bioproducto:

- a) Densidad: 1,114 g mL⁻¹
- b) pH: 6,5
- c) Estado físico: LÍQUIDO
- d) Color: VERDE
- e) Olor: FERMENTESIBLE
- f) Suspensión en agua: ALTA
- g) Porcentaje de volatilidad: BAJO

SECCIÓN V

V.1. Riesgos de fuego o explosión: NULOS

SECCIÓN VI

Datos de reactividad

VI.1 Compatibilidad: *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 es compatible con herbicidas, insecticidas químicos, fertilizantes de reacción ácida e insecticidas biológicos cuya formulación sea a base de hongos, y no es compatible con fungicidas, ni con productos desinfectantes del suelo. Además, es compatible con insecticidas cuyo ingrediente activo sean la Cipermetrina y Metamidofos. Tolera a los fungicidas como Captán, Sulfato de

Cobre pentahidratado y Clorotalonil. En esta investigación se determinó que es compatible con Milagro, Kriptón, Tagushi, Cupront, Oilpalma, Biopalma (fungicidas).

SECCIÓN VII

Riesgos a la salud y primeros auxilios

VII.1 Toxicidad:

Toxicidad aguda: DL50 oral: no definida DL50 dermal: no definida

Toxicidad EPA: IV (formulación): Síntomas de intoxicación: Está documentado que este producto es selectivo para hongos fitopatógenos, no provoca perjuicios a otros seres vivos.

Todos los estudios de toxicidad y patogenicidad realizados están basados en los siguientes documentos: *Environmental Protection Agency*. USA. 2001. *Microbial Pesticide Test Guidelines*. OPPTS 885, *The Good laboratory Practice Standards Part 160 Title 40 Code of Federal Regulations CFR*, 1999, *Principles of Good laboratory Practice standards OECD*, 1999. En *Official Journal of the European Communities*, L 77/9-33.

Todos los materiales que componen el producto formulado líquido no son tóxicos y están incluidos en la lista de la *Environmental Protection Agency* en sus hojas de seguridad.

Toxicidad / Patogenicidad aguda oral en ratas. La cepa de *Trichoderma harzianum* no es patogénica, infectiva ni tóxica en ratas, cuando estas son dosificadas por vía oral con 1×10^8 conidios por animal. La evacuación de la mayoría de los conidios ocurre en la primera semana después de la administración. Las esporas de *T. harzianum* ingeridas por el animal no tienen ningún efecto dañino sobre los órganos, ni tejidos, ni causan ninguna pérdida de peso ni muerte en los animales durante la prueba.

Toxicidad / Patogenicidad Aguda Pulmonar en ratas. La cepa de *Trichoderma harzianum* no es patogénica, infectiva ni tóxica en ratas, cuando estas son expuestas por instilación traqueal a una dosis sencilla de 1×10^8 conidios por animal. No se observan lesiones en los pulmones de ninguno de los sexos, tampoco se observa ningún tipo de infección en los tejidos. Las esporas de *Trichoderma harzianum* inhaladas por el animal no tienen ningún efecto dañino sobre los órganos, ni tejidos, ni causan ninguna pérdida de peso ni muerte en los animales durante la prueba.

Sensibilidad cutánea en ratas. El producto TRIKOFUN, que contiene la cepa de *Trichoderma harzianum* no es patogénico, infectivo, ni tóxico en ratas cuando a estas se les administró repetidamente sobre la piel. No se presenta dermatitis de contacto

alérgico, ni ninguna reacción cutánea de tipo inmunológico generada por el contacto repetitivo de la formulación sobre la piel.

VII.2 Sustancia considerada como:

- a) Carcinogénica NO
- b) Mutagénica NO
- c) Teratogénica NO

Antídoto: no definido.

Tratamiento médico: sintomático.

SECCIÓN VIII

Indicaciones en caso de fuga o derrame

VII.1 Procedimiento y precauciones inmediatas. Utilice guantes y lentes de seguridad. En caso de derrame de pequeñas cantidades, puede usar un material absorbente para recolectar al mismo (el producto es biodegradable). Para el caso de grandes derrames regrese a un recipiente el material y disponerlo en el basurero municipal y o planta de tratamiento de aguas.

SECCIÓN IX

Protección especial específica

IX.1 Equipo de protección personal específico

Valor de control sugerido o TLV (*Threshold limit value* o valor límite de exposición):

No existe un TLV asignado para esta mezcla.

Se debe minimizar la exposición de acuerdo con la práctica de higiene del trabajo adecuada.

Ventilación: Se puede usar cualquier tipo de ventilación, de preferencia del tipo mecánico. Se trata de un producto biodegradable.

Ropa de protección: Tome todas las precauciones para evitar el contacto con la piel. Basta con tela de poro abierto de poliéster o algodón. Para personas con piel muy sensible o alérgica, extremar las medidas.

Protección para los ojos: Se recomienda el uso de lentes de seguridad:

Otros equipos de protección: para las manos, se recomienda utilizar guantes de goma, y para la boca y nariz usar mascarilla.

SECCIÓN X

Información sobre ecología

X.1 De acuerdo con las disposiciones de la Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, en materia de agua, aire, suelo y residuos peligrosos

Por su naturaleza no afecta la fauna microbiológica del suelo

Persistencia y degradabilidad: producto biodegradable

Eco-toxicidad:

Especificidad y efectos sobre organismos no blanco

No se conocen efectos adversos en el hombre, aves, peces, ranas, lombrices de tierra, abejas, microorganismos benéficos o plantas de follaje sensible.

SECCIÓN XI

Precauciones especiales:

XI.1. Para el manejo, almacenamiento y disposición de envases

Manejo

- El TRIKOFUN se puede aplicar con los métodos convencionales de aspersión, en suelo y follaje, en cualquier etapa del ciclo del vegetal.
- Aplicar en horas de la mañana o por la tarde.
- Utilizar agua y un recipiente limpio, libre de residuos de fungicidas.
- Adicionar TRIKOFUN y agite hasta que se mezcle completamente, verter en la cantidad de agua total.
- Utilizar coadyuvantes compatibles en caso de ser necesarios.
- Mantener el producto fuera del alcance de los niños.
- No fumar ni consumir alimentos durante el manejo, mezcla o uso del producto.
- El uso cuidadoso de cualquier producto es una buena práctica.
- Se recomienda la aplicación del producto usando una dosis de 1,0 a 5,0 L ha⁻¹ en dependencia del desarrollo de la enfermedad. El producto contiene $2,5 \times 10^9$ conidios viables por mililitro de producto.
- El producto es seguro para el ser humano siempre y cuando se use como se indica.
- Se alcanza una máxima eficiencia si se emplean boquillas de alta nebulización que garanticen un buen cubrimiento sobre el follaje de las plantas. Dirija la aplicación a los sitios donde se desarrolla el ciclo de vida de los fitopatógenos.
- El producto mezclado con agua no se puede almacenar y debe ser empleado completamente.

Almacenamiento: Guardar en un lugar fresco lejos de los rayos solares. El calor y el sol pueden afectar la actividad microbiana, de preferencia en refrigeración a 4,0 °C.

Disposición de envases usados: Luego de haber enjuagado el envase por triplicado éste puede ser desechado en un basurero municipal o llevado a un centro de reciclaje. No reutilice los recipientes.

SECCIÓN XII

Otra información

La información que contiene esta hoja de datos de seguridad, está basada en los datos disponibles sobre el producto tanto a nivel de laboratorio como de campo. Se recuerda a los usuarios que el uso del producto para aplicaciones diferentes de las que está diseñado o aconsejado, puede acarrear eventuales riesgos. Tomará bajo su exclusiva responsabilidad las precauciones inherentes al uso del producto.

Fecha de Emisión: Julio 07 de 2013

Responsable: Jefe de Producción y Control de Calidad de MIKROBEN / Dra. Marcia Azucena Pesántez Macancela M Sc.

Discusión General

Entre los principales obstáculos para la ampliación de la utilización de los bioproductos en la producción agrícola de Ecuador están la escasez de las formulaciones debidamente registradas. La aplicación de los mismos criterios que rigen los agrotóxicos de base química hace que el proceso sea costoso y lento. Por otra parte, la comercialización y utilización de productos no registrados dificulta la fiscalización y propicia el surgimiento de productos de baja calidad y que terminan por generar pérdida en la credibilidad por parte de los agricultores en la eficiencia de *Trichoderma* en el control de enfermedades en las plantas. Además, las empresas se han visto perjudicadas por la competencia en el mercado ecuatoriano de productos no registrados de baja calidad y menor costo. La ausencia de registro de los productos impide que sean utilizados en sistemas certificados para la exportación, lo que puede generar barreras no tarifarias en el desarrollo del agronegocio ecuatoriano (CORPEI, 2011).

Todo este proceso complejo de registro de bioproductos, requiere investigaciones, comprobaciones y, sobre todo, un ordenamiento para que además de cumplir con el requisito fundamental de tener una buena efectividad biológica, y servir para el fin para el cual fueron concebidos y recomendados, no entrañen riesgos innecesarios para la salud del hombre o el medioambiente donde habita (Andrews, 1992). En este trabajo de tesis las investigaciones estuvieron encaminadas a dotar a los productores de banano orgánico de un bioproducto registrado, con efecto antifúngico frente a *Mycosphaerella*

fijiensis, agente causal de la Sigatoka negra, que pudiera cumplir con los requisitos anteriormente expuestos.

Según el criterio de varios investigadores, entre ellos Thangavelu *et al.* (2004), el éxito del control biológico en plantas cultivadas depende no solo de la efectividad del antagonista, sino también de los costos y del método de aplicación. Atendiendo a lo anterior, en este estudio el efecto del antagonista se evaluó en cultivo dual *in vitro* frente al patógeno, en casa de cultivo en plantas inoculadas artificialmente con *M. fijiensis* y en campo en plantas naturalmente infectadas. En todos los casos se comprobó el efecto antifúngico y su eficacia alcanzó valores superiores al control sin inocular, lo cual indicó el potencial biocontrolador de cepas de *Trichoderma* frente al agente causal de la Sigatoka negra.

Sin embargo, para la producción de un bioproducto la reducción de los costos en el proceso productivo debe garantizarse desde el principio. En este sentido, el criterio de selección inicial de la cepa se basó en la variable velocidad de crecimiento, los sustratos y adyuvantes utilizados fueron subproductos agrícolas o de bajo costo, de fácil adquisición en mercados locales y se contó con un biorreactor diseñado y construido para este fin en la Universidad, el cual aumenta la eficiencia del proceso y reduce el tiempo de fermentación. El uso de sustratos baratos, que puedan proveer de una gran superficie que garantice la aireación y densa esporulación del microorganismo en un corto período de tiempo están entre las condiciones necesarias para que un proceso fermentativo tenga bajos costos (Andrews, 1992).

El sistema de fermentación sólido empleado en este estudio se encuentra entre los más usados para producir cantidades adecuadas de inóculo viable de cepas de *Trichoderma* que son el ingrediente activo de diferentes formulaciones comerciales, fundamentalmente en forma de polvos humedecibles, polvo seco, formulaciones en aceite y encapsulados que contienen el hongo (Fernández-Larrea, 2006).

Finalmente, se concibió como método de aplicación la aspersión con medios manuales o avionetas. Por ello, las formulaciones elaboradas se diseñaron libres del sustrato de fermentación (las partículas residuales pueden obstruir los conductos de los medios de aplicación) y con una alta concentración de conidios. El empleo de una máquina separadora de esporas diseñada y construida en la ESPOCH garantizó la pureza y concentración de conidios, y la adición de adyuvantes permitió la aplicación directa del producto con garantía de nutrientes para la efectividad del antagonista.

Los resultados indicaron un efecto antifúngico *in vitro* de las cepas de *Trichoderma* frente a *M. fijiensis* por competencia y parasitismo que estuvo en correspondencia con una reducción cuantitativa de la enfermedad, tanto en casa de cultivo como en campo. Ambos mecanismos de acción pudieran permitir el empleo del bioproducto con efecto preventivo

(coloniza la hoja y compite por espacio y nutrientes con el patógeno e impide que se establezca) o curativo en la fase inicial de la enfermedad en que el patógeno tiene crecimiento epifítico por destrucción de sus hifas. No obstante, es necesario tener en cuenta otros factores como el carácter policíclico de la enfermedad, el ritmo de emisión foliar, la presión de inóculo en la plantación y las condiciones climáticas que favorecen el desarrollo de la enfermedad.

Este estudio se llevó a cabo en una plantación de la región Costa de Ecuador, considerada como bosque muy seco tropical (bms-T), con una precipitación media anual de 800,0 mm y una temperatura media de 24,0°C, lo cual limita en alguna medida el desarrollo de la enfermedad con respecto a otras zonas productoras de banano donde la humedad relativa y las precipitaciones son más elevadas. Sin embargo, bajo estas condiciones la eficacia fue aproximadamente la mitad del tratamiento químico con el uso de un solo producto en dos ciclos de cultivo y es la primera evidencia de efecto positivo de una formulación de *Trichoderma* frente a esta enfermedad a escala de campo. Unido a los resultados de alta compatibilidad con productos empleados en las bananeras orgánicas para la protección de las plantas, se recomienda su uso como parte del programa de manejo integrado que se aplica en las bananeras orgánicas.

Otro aspecto positivo de la aplicación de este bioproducto en campo fue su efecto promotor del crecimiento en la fase de crecimiento vegetativo y en el rendimiento, lo cual podría reducir los costos por aplicación de fertilizantes. La promoción del crecimiento de plantas de diferentes especies por cepas de *Trichoderma* ha sido informado previamente en otros estudios y validan el creciente interés en el desarrollo de bioproductos con este antagonista a nivel mundial, con resultados no solo a nivel de laboratorio sino globalmente en la agricultura y el ambiente (Woo *et al.*, 2014).

No obstante, aunque se necesita mucho más trabajo que contribuya a dilucidar y entender los mecanismos involucrados en el control de *M. fijiensis* por *Trichoderma*, se abren nuevas perspectivas para el uso de un bioproducto de *T. harzianum* en bananeras orgánicas de Ecuador y los resultados sugieren nuevas investigaciones acerca de las interacciones entre la planta, el patógeno y el antagonista en la filosfera de *Musa*. El conocimiento de los mecanismos de acción del antagonista en este patosistema podría contribuir a optimizar las condiciones que permitan expresar al antagonista su potencial máximo de biocontrol y mejorar la eficacia de este bioproducto en el manejo de la enfermedad.

El bioproducto obtenido tiene gran valor práctico, económico y social. En este sentido, fue diseñado para responder a las necesidades de los productores, tiene efectividad biológica y garantiza que los resultados económicos por su aplicación sean favorables con

beneficios netos tanto para la ESPOCH que lo produce y comercializa como para los productores que lo adquieren. Por otra parte, ha contribuido a la formación de profesionales en varias carreras de la ESPOCH que se vincularon al trabajo y aportaron soluciones novedosas y de gran valor como parte de sus tesis de finalización de grado, y ha permitido la capacitación de productores no solo de la hacienda donde se realizó el ensayo sino de otras bananeras orgánicas del país.

Makovitzki *et al.* (2007) expresaron que las enfermedades de las plantas constituyen una amenaza emergente para la seguridad alimentaria global. Muchos de los agentes antimicrobianos disponibles para uso agrícola son altamente tóxicos y no biodegradables lo cual genera una elevada contaminación ambiental. En la producción de bananos los pesticidas usados para el control de la Sigatoka negra, con 15-60 aplicaciones por año representan más del 78,3% de los gastos totales (Pérez, 2013). Después de este estudio, productores orgánicos de banano de Ecuador han incluido este bioproducto como parte del manejo integrado de la enfermedad en combinación o alternando con otros, y cuatro empresas productoras/comercializadoras de banano centran las compras del bioproducto a la ESPOCH que ha mostrado una tendencia ascendente en los últimos siete años con aproximadamente 27 000 litros vendidos (Anexo 4).

A partir de los resultados se conformó un esquema metodológico de trabajo desde la selección de cepas pertenecientes a la Colección de Cultivos Microbianos de la ESPOCH hasta el registro de un bioproducto nombrado Trikofun, cuyo ingrediente activo son conidios de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 y que se presenta en dos formulaciones (polvo seco y formulado líquido) (Figura 20). Este pudiera servir de base para la elaboración de otros bioproductos con efecto sobre diferentes patógenos de cultivos de interés económico.

Los plaguicidas biológicos, así como el Manejo Integrado de Plagas, ofrecen una alternativa para la sostenibilidad de los sistemas agrícolas en una agricultura ambientalmente sana, socialmente justa y económicamente viable. Los resultados de este trabajo contribuyen a la transformación de la matriz productiva que es uno de los retos más ambiciosos del país, el que permitirá al Ecuador superar el actual modelo de generación de riquezas: concentrador, excluyente y basado en recursos naturales, por un modelo democrático, incluyente y fundamentado en el conocimiento y las capacidades de las y los ecuatorianos.

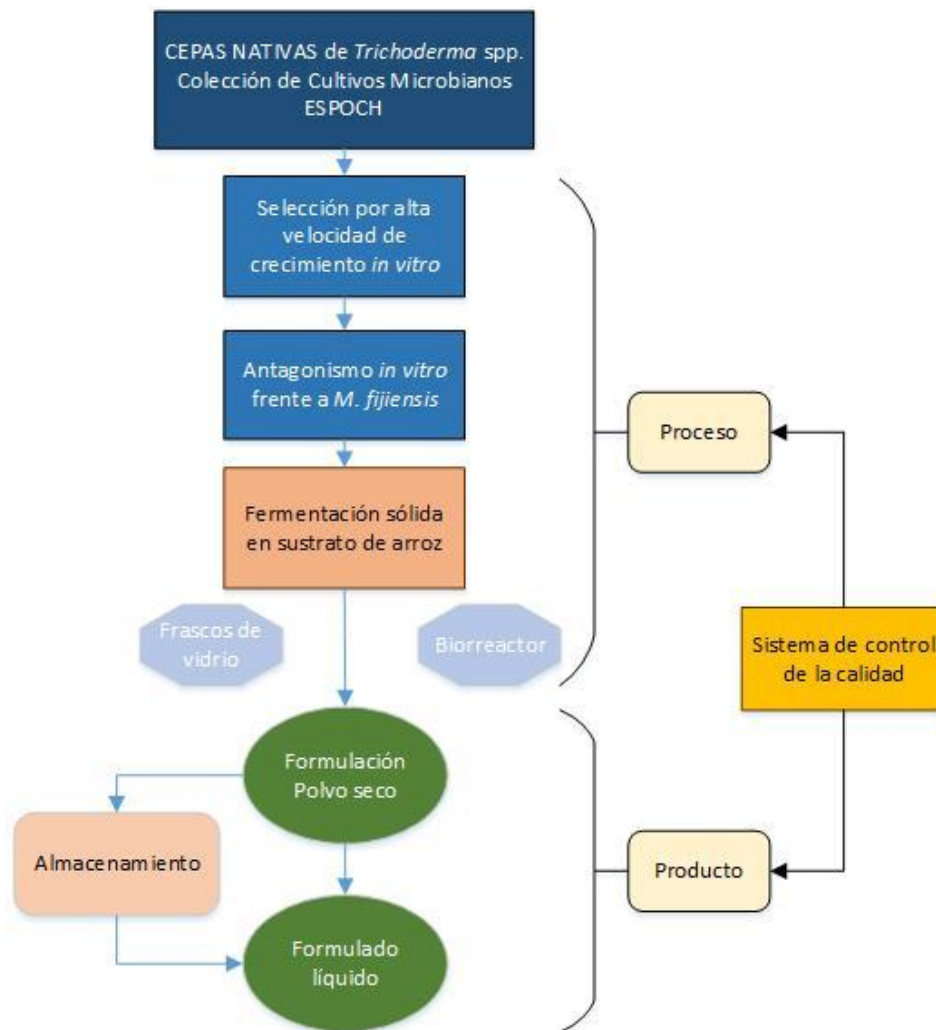


Figura 20. Esquema metodológico de trabajo propuesto para la elaboración del bioproducto Trikofun.

Además, tributa al cumplimiento del tercer eje que es la sustitución selectiva de importaciones. Su finalidad es reemplazar ciertos productos que actualmente se importan por su producción nacional. Por ejemplo, producir banano orgánico usando dentro de su paquete fitosanitario, controladores biológicos para el manejo de la Sigatoka negra, mediante el bioproducto generado a través de la investigación de profesionales ecuatorianos con el apoyo de la universidad y que reemplazaría el uso de plaguicidas importados de origen químico que deterioran el ambiente y la salud de los productores y consumidores.

El desarrollo del bioproducto Trikofun a partir de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* pretende contribuir a la sostenibilidad ambiental y económica de la producción de banano orgánico en Ecuador.

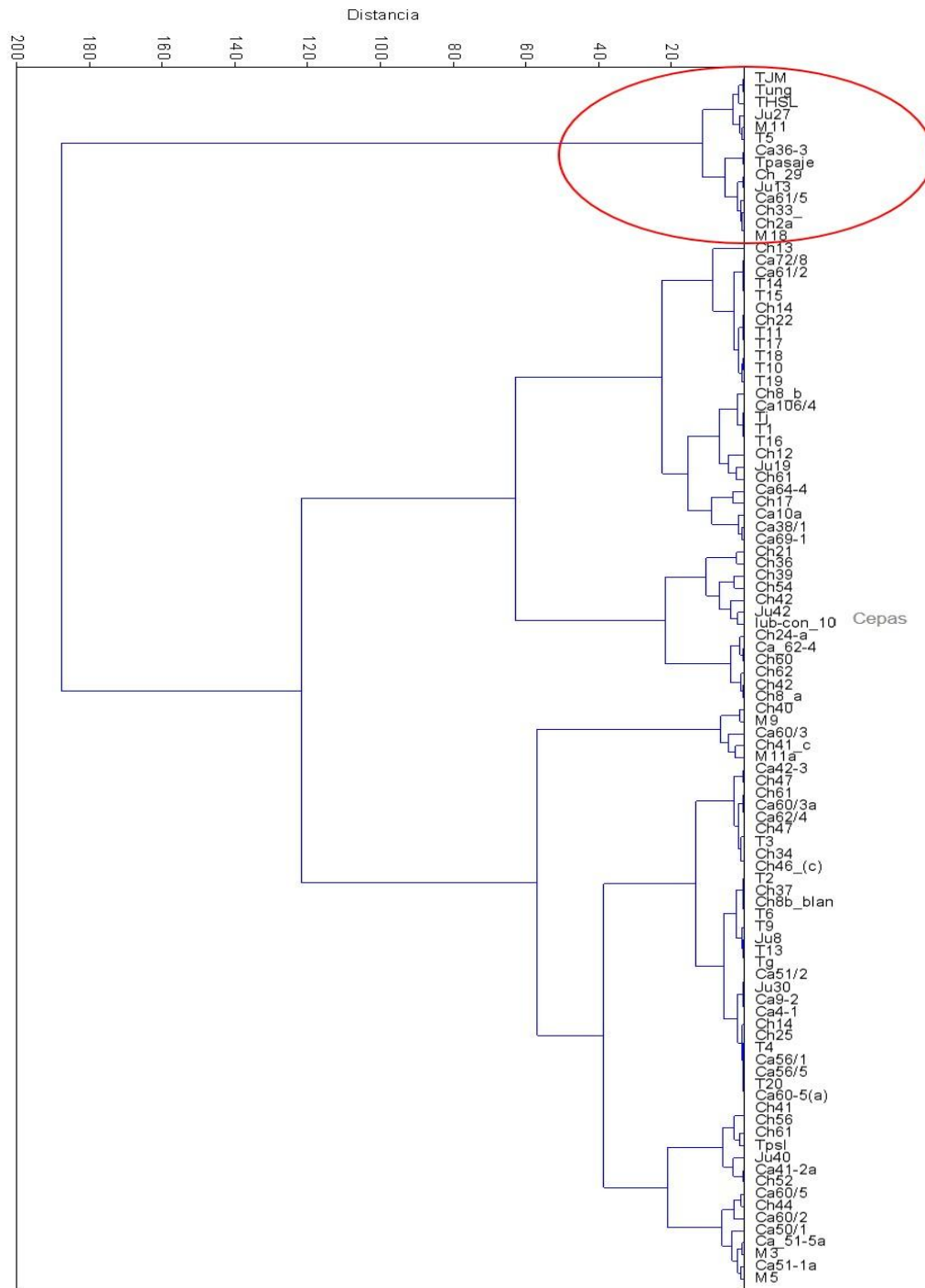


Figura 5. Dendrograma construido mediante el método de Ward utilizando distancia euclidiana, para la agrupación de 100 cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelo, en base a su crecimiento radial en medio de cultivo PDA. Incluye los datos del crecimiento a las 24, 48 y 72h de incubación. Cepas señaladas en círculo rojo habían cubierto toda la superficie del medio de cultivo a las 48h de incubación.

5. CONCLUSIONES

1. Fue posible seleccionar cepas nativas de *Trichoderma* spp. por su velocidad de crecimiento *in vitro* y su antagonismo frente a *M. fijiensis* en las que se identificaron tres especies presentes: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. pseudokoningii*. Se comprobó que la actividad antagónica fue de grupo 1 con intensidad elevada y vacuolización y lisis de las hifas, lo cual demostró la presencia de competencia por espacio y nutrientes y adicionalmente micoparasitismo.
2. Se obtuvo una formulación líquida a base de conidios de *T. harzianum* CCCh-p1. Esta cepa alcanzó concentraciones del orden de 10^9 en fermentación sólida en un sustrato de arroz tanto en frascos de vidrio de 750,0 mL de capacidad como en un biorreactor. La eficiencia en casa de cultivo fue de 97,6% y la viabilidad del 85,0% almacenada por 40 días a 4,0 ó 14,0 °C.
3. El potencial de biocontrol se validó en campo donde redujo el índice de infección y tuvo una eficacia entre 18,0 y 24,6%. Además, estimuló el crecimiento de las plantas tanto en la fase de crecimiento vegetativo como en la cosecha. El análisis económico demostró la factibilidad de aplicar $5,0 \text{ L ha}^{-1}$ del bioproducto en el manejo de la enfermedad en una bananera orgánica. La tasa de retorno marginal y los beneficios netos fueron superiores. Igualmente se comprobó su compatibilidad con productos empleados para la protección de las plantas que permiten su uso combinado o alternado en esquemas de manejo integrado de la enfermedad.
4. Los resultados de este estudio, unido al desarrollo de un sistema de control de la calidad al proceso y al producto final, posibilitaron el registro del bioproducto, con la marca TRIKOFUN, en el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Ecuador. Ello permite disponer, por primera vez, de un producto a base de conidios de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* con efecto en campo sobre Sigatoka negra, el cual puede aplicarse en el cultivo orgánico de bananos para el manejo de la enfermedad.

6. RECOMENDACIONES

1. Continuar profundizando en estudios relacionados con los mecanismos de acción de *Trichoderma harzianum* CCCh-p1 sobre *M. fijiensis* *in vitro*, en casa de cultivo y campo.
2. Evaluar alternativas para incrementar la viabilidad del bioproducto TRIKOFUN en el tiempo en diferentes condiciones de almacenamiento.
3. Evaluar el establecimiento de un sistema de aseguramiento a la calidad en la producción del bioproducto que cumpla con las normas internacionales al respecto.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abadie C, Elhadrami A, Fouré E, Carlier J (2003) Efficiency and durability of partial resistance against black leaf streak disease. Pag 161-168 En: *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook. L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marín, R. Ortiz, R. Romero y J. V. Escalant, eds. Proc Int. Workshop on *Mycosphaerella* Leaf Spot Diseases, 2nd, San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, Montpellier, Francia.
2. Acosta-Suárez Mayra, Pichardo Tatiana, Roque Berkis, Cruz-Martín Mileidy, Mena Eilyn, Leiva-Mora Michel, Castro Rosa, Alvarado-Capó Yelenys (2013) Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología Vegetal* Vol. 13 (4) 231 - 235.
3. Adebesein Abolade Ayodeji, Chris Adegboyega Odebode, Awo Maria Ayodele (2009) Control of postharvest rots of banana fruits by conidia and culture filtrates of *Trichoderma asperellum*. *Journal of Plant Protection Research* 49 (3): 302-308.
4. Adekule, A.T., K.F. Cardwell, D.A. Florini, and T. Ikotun. (2001). Seed Treatment with *Trichoderma* Species for Control of Damping-off of Cowpea Caused by *Macrophomina phaseolina*. *Biocontrol Science and Technology* 11: 449-457.
5. Agrios GN (2005) Plant pathology. 5th Ed. Academic of Phytopathological Society Press, San Diego, CA. USA. 819p.
6. AGRONET (2012) Reportes estadísticos, producción nacional por producto. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. Disponible desde internet en: <http://www.agronet.gov.co/agronetweb1/Estad%c3%adsticas/ReportesEstad%c3%adsticos.aspx> (con acceso 02/28/2012).
7. Ahmad, J.S., y Baker, R. (1987) Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77:182-189.
8. AILA (Asociación de Industriales Latinoamericanos) (2014) Federación Nacional de Cámaras de Industriales del Ecuador Rubro banano [En Línea en: <http://aila.la/institucion/organigrama/noticias/banano/ecuador> (Consultado el 10/02/2015).
9. Akrami M, SH Ibrahimov A, Zafari DM, Valizadeh E (2009) Control *Fusarium* rot of bean by combination of by *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* in greenhouse condition. *Agricultural Journal* 4: 121-123.
10. Alexopoulos CJ, Mims CW (1979) Introductory Mycology. En: John y Sons (eds). New York.
11. Altieri, M A. (2001). El control biológico en América Latina en su contexto histórico. Manejo Integrado de Plagas: 12: 82-107. *Biotecnología Agrícola: mitos, riesgos ambientales y alternativas*. Oakland, California. CIED/ PED-CLADES/ FOOD FIRST. 90 p.
12. Alvarado-Capó Y, Leiva-Mora M, Dita Rodríguez MA, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Portal N, Kosky RG, García LR, Bermúdez-Caraballosa I, Padrón-Montesino J (2003) Early evaluation of black leaf streak resistance on *Musa* spp breeding programme by the use mycelium suspension of *Mycosphaerella fijiensis* En: *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana: present status and outlook. Proceedings of the workshop on *Mycosphaerella* leaf spot

- diseases. (Jacome L, Leproive P, Martin D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (eds) :169-175. INIBAP, Montpellier.
13. Alvindia DG y Natsuaki KT (2008) Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Prot* (27):1200–1207.
 14. Alvindia Dionisio G (2012) Inhibitory influence of biocontrol agents, plant oils and an inorganic salt on *Mycosphaerella fijiensis* and *Cordana musae*, the causal pathogen of black sigatoka and leaf spot of banana *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(19), pp. 4179-4184.
 15. Andrews John H (1992) Biological control in the phyllosphere *Annual review of Phytopathology* 30: 603-635.
 16. Arzate Vega Juan, Alejandro Casimiro Michel Aceves, Víctor Manuel Domínguez Márquez, Osmín Antonio Santos Eméstica (2006) Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24 (002): 98-104.
 17. Asociación de Bananeros del Ecuador (A.E.B.E) (2012) Análisis de la industria bananera. Agronegocios [En línea] En: <http://www.agronegocios.com.ec> (Consultado el 15/01/2015).
 18. Asociación de Bananeros del Ecuador (A.E.B.E) (2013) Análisis de la industria bananera. Guía Banascopio [En línea] En: <http://www.probanano.com> (Consultado el 15/01/2015).
 19. Astiz Gassó MM, Pagliocca R, Varaschin C (2010) Comportamiento del formulado biológico Biagro TL en el manejo integrado de enfermedades. Resúmenes 2º Congreso Argentino de Fitopatología. pp. 373.
 20. Bae Hanhong, Roberts Daniel P., Lim Hyoun-Sub, Strem Mary D., Park Soo-Chul, Ryu Choong-Min, Melnick Rachel L., and Bailey Bryan A (2011) Endophytic *Trichoderma* Isolates from Tropical Environments Delay Disease Onset and Induce Resistance against *Phytophthora capsici* in Hot Pepper Using Multiple Mechanisms *MPMI* Vol. 24 No. (3). pp. 336–351.
 21. Barrera V Babbitt S y Martínez MC (2006) Characterization of fungal biocontrol agents and pathogens from soil. En: *Biological Control of Soilborne Plant Diseases*, JICA, Buenos Aires. Pp. 148-161.
 22. Barrera VA (2012) El género *Hypocrea* Fr. (Hypocreales, Ascomycota) en la Argentina. Estudio de la variabilidad molecular de su estado anamórfico *Trichoderma*. Universidad de Buenos Aires. Tesis de Doctorado. 241 pp.
 23. Bell DK, Wells HD, Markaman CR (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. against six fungal pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382
 24. Berlanga-Padilla, (2006) Efecto de hongos entomopatógenos en depredadores del pulgón café de los cítricos (Homoptera: Aphididae), p. 384-388. In: *Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico*. Manzanillo, Colima, México.
 25. Bettiol Warner, Marcelo Augusto Boechat Morandi, Zayame Vegette Pinto, Cleusa Maria Mantovanello Lucon, Murillo Lobo Júnior, João de Cássia do Bomfim Costa, Trazilbo, José de Paula Júnior, Hudson Teixeira, Andréa Bittencourt Moura (2014) Metodología para el control de calidad de productos biológicos a base de *Trichoderma*. Sao Paulo, Brasil, pp. 30.

26. Bettiol, W. Rivera, M.C. Mondino, P. Montealegre, J.R. Colmenárez, Y.C. (Eds.) (2014) Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe Buenos Aires, Argentina ISBN: 978-9974-0-1091-8
27. Bissett J (1984) A revision of the genus *Trichoderma*. I. Sect. *Longibrachiatum* sect. nov. Canadian Journal of Botany 62: 924-931.
28. Bissett J (1991) A revision of the genus *Trichoderma*. spp., Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany, 69:2357-2372.
29. Bissett J (1991a) A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany 69:2357-2372.
30. Bissett J (1991b) A revision of the genus *Trichoderma*. III. Sect. *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany 69:2373-2417.
31. Bissett J (1991c) A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany 69:2418-2420.
32. Blaszczyk I Popiel D Chelkowski J Koczyk G Samuels GJ Sobieralski K y Siwulski m (2011) Species diversity of *Trichoderma* in Poland Journal of Applied genetics 52:233-243.
33. Borrás, O Pérez M. Cristina., Nogueira, J., Felix, E., Martín, A. (1997) Empleo de *Trichoderma viride* en el control de la pudrición de la piña causada por *Phytophthora nicotinae* var parasítica en la fase de adaptación de vitroplantas y segmentos de tallos de piña en el suelo. Extent: v.93-94(4) Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria La Habana: ISCA.
34. Brandão Góes Larissa; Ana Bolena Lima da Costa; Laurineide Lopes de Carvalho Freire, Neiva Tinti de Oliveira (2002) Randomly Amplified Polymorphic DNA of *Trichoderma* Isolates and Antagonism Against *Rhizoctonia solani*. Vol.45, N. 2. pp. 151-160
35. Burke JJ y Dunne B (2008) Investigating the effectiveness of the Thies Clima "Septoria Timer" to schedule fungicide applications to control *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat in Ireland. Crop protection 27 (3): 710-718.
36. Burt John Peter J A y Ramírez Fernando (1998) Airborne spore loads and mesoscale dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain Aerobiologia 14 209-214.
37. Cajo A Valladares J (2005) Diseño y Construcción de un sistema de secado y separación de esporas de *Trichoderma sp* cultivadas en un sustrato de cascarilla de arroz Facultad de Recursos Naturales Escuela de Ingeniería Agronómica Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Riobamba- Ecuador pp. 17-22.
38. Carlier J, De-Waele D, Escalant JV (2002) Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nematodos. Evaluación del comportamiento (A. Vézina y C. Picq, eds). Guías técnicas INIBAP 6. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.

39. Carr C (2009) Aislamiento y selección de hongos antagonistas en plantaciones de banano para el combate biológico de la Sigatoka negra. Tesis Lic. Tecnológico de Costa Rica, San Carlos. Costa Rica.
40. Carr, C. (2013) Aislamiento y selección de bacterias epífitas antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra, del filopiano de musáceas con diferente nivel de resistencia a la enfermedad y en diferentes condiciones de cultivo. Tesis Mag. Sci. ITCR, Cartago, Costa Rica. 87 p.
41. Castrillo María L. Bich Gustavo A. Zapata Pedro D. Villalba Laura L. (2014) Selección de condiciones de cultivo óptimas para la secreción de endoglucanasas por cepas de *Trichoderma* nativas de Misiones Rev. Cienc. Tecnol. Año 16 / Nº 21 / 2014 / 15–19.
42. Catastro del Banano (2013) Ministerio de Agricultura Ganadería y Ambiente del Ecuador. Documento de trabajo del Censo Agropecuario 2012.
43. Ceballos, I, Mosquera S, Angulo M, Mira JJ, Argel LE, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peraltas S y Villegas V (2012) Cultivable bacteria population associated with leaves of banana and plantain and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. Environmental Microbiology 64:641-653.
44. Chakraborty, B.N.; Chakraborty, U.; Saha, A.; Dey, P.L.; Sunar, K. (2010) Molecular Characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* Isolated from Soils of North Bengal Based on rDNA Markers and Analysis of Their PCR-RAPD Profiles. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry. 5 (1): 55-61.
45. Chaverri P, Castlebury LA, Samuels GJ y Geiser DM (2003) Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/Hypocrea lixii complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 27:302-313.
46. Chaverri, P y G. Samuels (2003) *Hypocrea virens* sp nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. Mycologia 93: 1113-24.
47. Chaverri, P. y Samuels, G.J., (2004) *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. Studies in Mycology 48, 1–116.
48. Chet, I (1987) *Trichoderma*-Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soil-borne plant pathogenic fungi. p. 137-160. En: I. Chet (ed.), Innovative Approaches to plant diseases. Wiley & Sons, New York, U.S.A.
49. Chouaki T, Lavarde V, Lachaud L, Raccurt CP, Hennequin C (2002) Invasive infections due to *Trichoderma* species: report of 2 cases, findings of in vitro susceptibility testing, and review of the literature. Clin Infect Dis 35:1360 – 1367
50. Churchill, A (2010) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Molecular Plant Pathology 14(2): 307-328.
51. CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) (2013) Descriptores para el banano (*Musa* spp.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.

52. Cobos, G. M. (2010) Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma spp.* para el Control de Sigatoka Negra (*Paracercospora fijiensis* M.) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio. Informe del Proyecto de Investigación presentado como Requisito Parcial para Optar al Título de Ingeniera Agropecuaria. Santo Domingo, Ecuador.
53. Colmenárez Yelitza Vásquez Carlos James Michael (2014) Control biológico de enfermedades de plantas en el Caribe En: Bettiol, W.; Rivera, M.C.; Mondino, P.; Montealegre, J.R.; Colmenárez, Y.C. (Eds.) Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe pp 139-156. Argentina.
54. Contreras-Cornejo Hexon Angel, Lourdes Macías-Rodríguez, Carlos Cortés-Penagos, José López-Bucio (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. Plant Physiology 149: 1579-1592.
55. Cook J, Baker K (1983) *Trichoderma*. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Third edition. APS Press. Minnesota-United States 58: 374-382.
56. Corporación de Promociones de Exportaciones e Inversiones (CORPEI) (2011) Estadísticas de comercio exterior [En línea] En: www.corpei.org. (Consultado el 21/01/2015).
57. Correa S, Mello M, Ávila ZR, Minaré BL, Pádua RR, Gomes D (2007). *Trichoderma spp.* strains for biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. Fitosanidad, 11: 3-8.
58. Craenen K. y Ortiz W (2003) Black sigatoka disease of banana and plantain. A reference manual. IITA Ibadan, Nigeria.
59. Cremaschi G, Andreau R, Chale W, Garbi M. Morelli G, Stocko M, Mónaco C, Martínez S. (2011). Efecto de cepas de *Trichoderma harzianum* sobre la producción de tomate producido bajo cubierta plástica. Resúmenes de las III Jornadas de Enfermedades en Cultivos bajo Cubierta. P. 83.
60. Crous PW y Mourichon X (2002) *Mycosphaerella eumusae* and its anamorph *Pseudocercospora eumusae* spp. nov., causal agent of Eumusae Leaf Spot Disease of Banana. Sydowia 54: 35-43.
61. Cruz-Martín Mileidy, Mayra Acosta-Suárez, Ivian Poveda, Michel Leiva-Mora, Berkis Roque, Yelenys Alvarado-Capó (2012) Actividad antifúngica *in vitro* de bacterias frente a *Mycosphaerella fijiensis* mediada por metabolitos difundidos y volátiles. Biotecnología Vegetal 12 (3):179-182.
62. Davet, P, Artigues M, Martin C (1981) Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte biologique. Agronomie 10(1): 933-936
63. De Lapeyre de Bellaire L, Fouré E, Abadie C y Carlier J (2010) Black leaf streak disease is challenging the banana industry. Fruits 65(6): 327-341.
64. Deacon JW y Berry J (1992) Biocontrol of soilborne plant pathogens with introduced bacteria. In: wood RKS, way MJ, eds. Biological control of pests, pathogens and weeds: Development and prospects. Philosophical Transactions of the Royal Society, London B 318: 357-73.

65. Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones (2011) Análisis del sector banano. Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones. pp.28.
66. Djonović, S., M.J. Pozo, and C.M. Kenerley (2006) Tvbn3, a β -1,6-Glucanase from the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens*, Is Involved in Mycoparasitism and Control of *Pythium ultimum*. Applied and Environmental Microbiology 72(12): 7661-7670.
67. Druzhinina I y Kubicek CP (2005) Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. J Zhejiang. 6B, 100-112.
68. Druzhinina IS Komon-Zelazowska M Atanasova L Seidl V y Kubicek CP (2010) Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamospecies related to it. pLoS ONE 5(2): e9191. Doi: 10.1371/journal.pone.0009191
69. Druzhinina IS Komon-Zelazowska M Ismael A Jaklitsch W Mullaw T Samuels GJ y Kubicek CP (2012) Molecular phylogeny and species delimitation in the Section *Longibrachiatum* of *Trichoderma* Fungal Genetics and Biology 49:358-369.
70. Druzhinina, I.; Kopchinskiya, A.; Komoń, M.; Bissett, J.; Szakacs, G.; Kubicek, C. (2006) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology. 42 (10): 813-828.
71. Elad Y (2000) Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop Protection 19: 709-714.
72. Elad Y, Zimand G, Zaqs Y, Zuriel S y Chet I (1993) Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathol 42:324-332.
73. Elmhirst Janice F. , C. Haselhan & Z. K. Punja (2011) Evaluation of biological control agents for control of botrytis blight of geranium and powdery mildew of rose, Canadian Journal of Plant Pathology, 33 (4): 499-505
74. Elósegui O (2006) Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. 62 pp.96-100.
75. EPA (Environmental Protection Agency) (2012) Alphabetical listing biopesticide active ingredients. <http://www.epa.gov/opp00001/biopesticides/ingredients/index.htm>
76. ESPAC (Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua) (2012) Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Ecuador.
77. Ezziyyani M., S.C. Pérez, M.E. Requena, L. Rubio and M.E. Candela. (2004) Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: 69-78.
78. Falconí C (1997) El Control Biológico de Plagas y Enfermedades. Primera Edición. Quito. Ecuador. 200 p.
79. Falconí C. (2014) Control biológico de enfermedades de plantas en Ecuador. Primera Edición. Quito. Ecuador. 58 p.

80. FAOSTAT (2012) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. [En línea] En: <http://faostat.fao.org> (Consultado 3/11/2012).
81. FAOSTAT (2014) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. [En línea] En: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Consultado 10/09/2014).
82. Fernández-Larrea O y O Elósegui (2006) Alternativas de producción de *Trichoderma* en Cuba, Fitosanidad 10 (2): 147
83. Fernández-Larrea O. (2006) Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de calidad, Fitosanidad 9 (3): 64
84. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2014). Implicaciones de los Cambios en la Política Comercial para la Competitividad de las Exportaciones de Banano Ecuatoriano al Mercado de la Unión Europea. [En línea] En: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Consultado el 23/11/2014).
85. Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO) (2010). [En línea] En: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Consultado el 23/09/2010).
86. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2011) FAOSTAT Statistics Division- Crops and livestock products. Available at Production-Crops: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/T/TP/S>.
87. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2012) FAOSTAT Statistics Division- Crops and livestock products. Available at Production-Crops: www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s00.h
88. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2013) FAOSTAT Statistics Division- Crops and livestock products. Available at Production-Crops: www.fao.org/publications/sofa/2013/es
89. FRAC (2012) Banana FRAC Minutes. In Banana Working Group Meeting, Miami, Florida, USA Summary and recommendations. pp.14.
90. FRAC (2013) Banana FRAC Minutes. In Banana Working Group Meeting, Miami, Florida, USA Summary and recommendations. pp.20.
91. Galletti Stefania, Pier Luigi Burzi, Claudio Cerato, Simona Marinello, Eleonora Sala (2008) *Trichoderma* as a potential biocontrol agent for *Cercospora* leaf spot of sugar beet. BioControl 53: 917-930.
92. Gamarra Sosa G (2013) Control biológico de hongos fitopatógenos del suelo con aislados de *Trichoderma* spp. en el cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Tesis Ing. Agr. San Lorenzo, PY, Carrera de Ingeniería Agronómica, FCA, UNA. 51 p.
93. García R. (2005) Comportamiento de *Trichoderma harzianum* sobre *Macrophomina phaseolina* en Ajonjolí (*Sesamo indicum*) y Girasol (*Helianthus annuus*). Tesis de MS. Agronomía-UCLA. Lara, Venezuela. 95 pp.
94. García S, Moya JD, Núñez P, Andújar FA, Avilés E (2013) Efectividad *in vitro* de cepas de *Trichoderma* spp. en la supresión del crecimiento micelial de fitopatógenos de suelo.

- Resúmenes 6to Congreso SODIAF, Juan Dolio, San Pedro de Macorís, República Dominicana, pp. 18.
95. Gauhl F (1990) Epidemiología y Ecología de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (*Musa* sp.) en Costa Rica, UPEB. Panamá. pp126.
96. Gauhl F (1994) Epidemiology and Ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on Plantain and Banana (*Musa* spp.) in Costa Rica, Central America. Montpellier, Francia, INIBAP.
97. Gautheret, A., Dromer, F., Bourhis, J.-H., and Andremot, A. (1995) *Trichoderma pseudokoningii* as a cause of fatal infection in a bone marrow transplant recipient. Clin. Infect. Dis. 20: 1063-1064.
98. González R, Bustamante E, Shannon O, Okumoto S, Lendro G (1996) Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Manejo Integrado de Plagas 40: 12-16.
99. Grupo Agrícola Prieto (2014) [En línea] En: <http://fairtrade.ca/en/producers/grupo-agricola-prieto-cimexpriba> (Consultado el 28/12/2014).
100. Grupo Quirola (2014) Banano [En Línea] En: <http://www.gquirola.com/index.html> (Consultado el 28/12/2014).
101. Guedez 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: 44-49.
102. Guedez C, Castillo C, Cañizalez L, Olivar R (2009) Control biológico una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. Revista ULA (13): 50-74.
103. Guijón-López C, Guerrero-Prieto V, Vargas-Albores F, Carvajal-Millán E, Bravo-Luna L (2010) Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 28: 87-96.
104. Gupta Vijai K. MoniKa S chMoll , Alfredo Herrera Estrella, R. S. Upadhyay , Irina Druzhinina Maria G. Tuohy (2014) Biotechnology and biology of *Trichoderma*. Elsevier. Amsterdam.
105. Guzmán M (2012) Control biológico y cultural de la Sigatoka negra. Tropical Plant Pathology 37 (Suplemento). 45° Congresso Brasileiro de Fitopatologia-Manaus, AM.
106. Guzmán M Romero RA (2010) Eficacia biológica en el combate de la Sigatoka negra de la aplicación con fungicidas con motobomba de espalda equipada con un cabezal de conversión electrostática Pag.212-216. In Informe Anual Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional CR). San José CR.
107. Guzmán Mauricio, Mario Orozco-Santos, Luis Pérez Vicente (2013) Sigatoka leaf spot diseases of bananas: dispersion, impact and evolution of management strategies in Latin American-Caribbean region. XX Reunião Internacional da Associação para a Cooperação em Pesquisa e Desenvolvimento Integral das Musáceas (Bananas e Plátanos) 9 a 13 de setembro. Acorbat. Brasil. Fortaleza, CE.

108. Guzmán, M. y Villalta, R (2006) Aporte de la deshoja sanitaria y prácticas adicionales, en el control de la Sigatoka negra en banano (*Musa AAA*). In CORBANA - INIBAP - MUSALAC. Manejo de la Sigatoka negra en banano y plátano en América Latina y el Caribe. Resúmenes, Congreso Internacional, San José, Costa Rica, 21-23 de Marzo. pp.58.
109. Haggag Mohy Wafaa M. Mohamed Eldin Soliman (2011) Biodiversity, Biological and Molecular Investigations of Biocontrol by the Genus *Hypocrea/Trichoderma* spp European Journal of Scientific Research Vol.65 No.2 pp. 281-292
110. Harman Gary E y Michal Shores (2006) The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. In: M Vurro and J Gressel (Eds.) Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management, pp.131–155. Springer. Dordrecht.
111. Harman Gary E y Michal Shores (2007) The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. In: M Vurro and J Gressel (Eds.) Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management, pp.131-155. Springer. Dordrecht.
112. Harman GE, Obregón GM, Samuels GJ y Lorito M (2010) Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and developed world. Plant Disease 94: 928-939.
113. Henderson J, Pattemore JA, Porchun SC, Hayden HL, Van-Brunschot S, Grice RE, Peterson RA, Thomas-Hall SR, Aitken EAB Black (2006) Sigatoka disease: new technologies to strengthen eradication strategies in Australia. Australasian Plant Pathology. 35: 181-193.
114. Henriquez, W.; R. D. Jeffers, T. E. Lacher and R. J.Kendall. (1997) Agrochemical use on banana plantations in Latin America; perspective on ecological risk. Environmental Toxicology and Chemistry 16: 91-99.
115. Hermosa R Viterbo A Chet I y Monte E (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 158:17-25.
116. Hermosa, I M. R. Grondona, E. A. Iturriaga, J. M. Diaz-Minguez, C. Castro, E. Monte and I. Garcia-Acha (2000) Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. Applied and environmental p. 1890-1898 Vol. 66, No. 5 Microbiology.
117. Hernández Alexander, Asdrúbal Arcia María Jiménez, Ulacio Dilcia y Méndez Naileth (2013) Caracterización molecular de doce aislamientos de *Trichoderma* spp. mediante RAPD y rADN-ITS. Bioagro 25 (3): 167-174.
118. Hernández, M. J. L.; Sánchez, P. M. I.; García, O. G. J.; Mayek, P. N.; González, P. J. M. y Quiroz, V. J. di C (2011) Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos el noreste de México. Rev. Colomb. Biotecnol. XIII (2):176-185
119. Hernández, Y., Portillo, F., Portillo, M.P., Navarro, C., Rodríguez, M. y Velazco, J (2006) Densidad estomática en materiales de plátano (*Musa AAB*, *AAAB* y *ABB*) susceptibles y resistentes a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet).Rev. Fac. Agron. 23(3):114-121.
120. Hjeljord, L., Tronsmo, A., (2003) *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications, vol. 2. Taylor and Francis, London, pp. 131–151.

121. Howell C (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1): 4-10
122. Hoyos-Carvajal L, Orduz S y Bisset J (2008) Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal genetics and Biology* 46: 615-631.
123. Hoyos-Carvajal y John Bissett (2011). Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics, The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution, PhD. Oscar Grillo (Ed.), ISBN: 978-953-307-772-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/the-dynamical-processes-of-biodiversity-case-studies-of-evolution-and-spatial-distribution/biodiversity-of-trichoderma-in-neotropics> In Tech Europe. Rijeka pp 303-320.
124. Hoyos-Carvajal, L, Orduz, S.; Bissett, J. (2009) Genetic and metabolic biodiversity of Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*.
125. Hoyos-Carvajal, L.; Chaparro, P.; Abramsky, M.; Chet, I.; Orduz, S. (2008) Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Revista Agronomía Colombiana*. 26 (3): 451-458.
126. IFOAM (*International Movement of Organic Agriculture Movements*) (2010) Definition of Organic Agriculture. [En línea]En: IFOAM <http://www.ifoam.org/growing-organic/definitions/doa/index.html>, and <http://www.ifoam.org> (Consultado el 10/01/2015).
127. Industria bananera ecuatoriana (2011). *Banano Ecuatoriano perspectivas*. 1 Edición.
128. Infante Danay, Benedicto Martínez, Belkis Peteira, Yusimy Reyes, Alfredo Herrera (2013) Molecular identification of thirteen isolates of *Trichoderma* spp. and evaluation of their pathogenicity towards *Rhizoctonia solani* Kühn. *Biotecnología Aplicada* 30: 23-28
129. INFOSTAT (2012) <http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2002/8880-es.html>. Tratado Internacional sobre Recursos Genéticos de las Plantas; en la actualidad los firmantes son 58 países y la comunidad europea. Organización de la Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. FAO. Sala de Prensa.
130. Instituto Geográfico Militar (IGM) (2012) *Cartografía de Ecuador*.
131. Jácome LH y Schuh W (1992) Effect of leaf wetness duration and temperature on development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Phytopathology* 85: 515-520.
132. Jain R.K. (2002) Watermelon bud necrosis tospovirus is a distinct virus species belonging to a serogroup IV. *Archives of Virology* 143:1637-1644.
133. Jaklitsch WM. (2011) European species of *Hypocrea* part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Diversity* 48: 1-250.
134. Jenkins NE y Grzywacz D (2000) Quality control of fungal and viral biocontrol agents – assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology* 10, 753-777.
135. Jiménez JM, Galindo JJ, Ramirez C (1987) Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* mediante bacterias epífitas. In: J J Galindo and R

- Jaramillo (Eds.) Proc. ACORBAT meeting, pp. 105-109. 7th. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
136. Jiménez M, A Arcia, D Ulacio y A Hernández (2012) Evaluación *Trichoderma* spp. y Acibenzolar-S-Metil (Bion) como inductor de resistencia a la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo (*Allium sativum*) bajo condiciones de campo. J. Selva Andina Res. Soc. 1(1): 14-25.
137. Jiménez P y Pantoja V (2012) Diseño y Construcción de un fermentador rotatorio de fase sólida para la multiplicación del hongo *Trichoderma* spp. Facultad de Ciencias Escuela de Ingeniería Química Tesis de Grado 113 p.
138. Johnson S J (1994) Classical biological control of the *citrus leafminer*. In: Managing The Citrus Leafminer. M. A. Hoy (Ed.). Proceedings of an International Conference. Orlando, FL, pp. 16-20.
139. Jones D (2003) The distribution and importance of *Mycosphaerella* leaf spot disease of banana. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. pp.25-42.
140. Jones DR (200) Diseases of banana, abaca and enset. CAB Int. Wallingford. UK. pp.544.
141. Kolombet L, Zhigletsova Z, Kosareva I, Bystrova N, Derbyshev V y Krasnova P (2007) Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum*. World J Microbiol Biotechnol. 24:123–31.
142. Kredics L, Antal Z, Doczi I, Manczinger L, Kevei F, Nagy E (2003) Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. Acta Microbiol Immunol Hung 50:105–117.
143. Kubicek C.P. y Harman G.E. (1998) *Trichoderma* and *Gliocladium*: Basic biology, taxonomy and genetics. Trends Microbiol. 6, 459-460.
144. Kubicek, C.P.; Mach, R.L.; Peterbauer, C.K.; Lorito, M. (2001) *Trichoderma*: from genes to biocontrol. J Plant Pathol 83: 11–24.
145. Kullnig-Gradinger CM. Szakacs G y Kubicek CP (2002) Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. Mycological research 106:757-767
146. Kumar, M. Sharma, P. (2011) Molecular and morphological characters: An appurtenance for antagonism in *Trichoderma* spp. African Journal of Biotechnology. 10 (22): 4532-4543.
147. Latone. B.A., E. Agosin, R. San Martin y G.S. Vasquez (1997) Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis bunch* rot of table grape in Chile. Crop Protection, 16(3): 209-214.
148. Leggett Mary , Jarrod Leland, Ken Kellar y Beth Epp (2011) Formulation of microbial biocontrol agents –an industrial perspective, Canadian Journal of Plant Pathology, 33 (2): 101-107
149. Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Roque B (2008) Incremento de la esporulación, caracterización morfológica y patogénica de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra Centro Agrícola, 35(2): 33-39

150. Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Roque B (2010) Protocolo para la inoculación artificial en plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. *Biotecnología Vegetal* 10(2): 79-88.
151. Lorito M, Sheridan L W, Harman GE y Monte E (2010) Translational research on *Trichoderma* from omics to the field. *Annual. Review. Phytopathology* 48: 395-417.
152. Makovitzki Arik, Ada Viterbo, Yariv Brotman, Ilan Chet, Yechiel Shai (2007) Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens *in vitro* and planta with ultrashort cationic lipopeptides. *Applied and Environmental Microbiology* 73(20): 6629–6636.
153. Marín DH y Romero RA (1992) El combate de la Sigatoka negra. San José, CR, Departamento de Investigaciones, CORBANA. Boletín No. 4. 21p.
154. Marín DH, Romero RA, Guzmán M, Sutton T (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87(3): 208-222.
155. Martínez Benedicto, Jesús Pérez, danay Infante, Yanisia Duarte, Martha Moreno (2013) Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm *Rev. Protección Veg.* Vol. 28 No. 3: 192-198
156. Martínez D. Berka RM. Henrissat B. saloheimo M. Baker SE. Chapman J. Chertkov O. Coutinho PM. Cullen D (2013) Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma resei* (syn. *Hypocrea jecorina*) *Nature biotechnology* 26:553-560.
157. Martínez I y Guzmán M (2010) Efecto de la fertilización foliar con tres fuentes de silicio sobre la severidad de la Sigatoka negra, el crecimiento y la producción del banano (*Musa* AAA, cv. Grande Naine). pp. 173-175. In *Informe Anual 2009, Dirección de Investigaciones CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR)*. San José, CR.
158. Martínez, B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños Heyker, Cruz A (2008) Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Revista de Protección Vegetal* 23(2):118-125.
159. Mayden RL (1997) A hierarchy of species concepts. The denouement in the saga of the species problem. In *Species: Units of Biodiversity*. Claridge MF, Dawah HA and Wilson MR (Eds.), pp 381-424 Chapman y Hall, London.
160. McGovern RJ, Winston AE, Rouse RE y Welch AW (2003) Reduction of defoliation in citrus caused by *Mycosphaerella citri* with a novel biocompatible fungicide. *Plant Diseases* 87: 134-138.
161. Meredith DS, Lawrence JS (1969) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transaction British Mycology Society* 52: 459-476.
162. Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Martínez-Rojero RD, Rodríguez-Morán NL, Riza-Flores R, Barrios-Ayala A (2008) Producción Masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14 (2): 185-191.

163. Michereff, S.J., Da-Silveira, N.S.S., Reis, A., y Mariano, R.L.R. (1995) Greenhouse screening of *Trichoderma* isolates for control of *Curvularia* leaf spot of yam. *Mycopathologia* 130:103-108.
164. Ministerio de Agricultura Ganadería Acuacultura y Pesca (MAGAP) (2011) "Estadísticas Agropecuarias" www.mag.sica.gov.ec
165. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) (2012) "Estadísticas Agropecuarias" [En línea] En: www.mag.sica.gov.ec
166. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) (2014) "Estadísticas Agropecuarias" [En línea] En: www.magap.gov.ec
167. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) (2013) "Estadísticas Agropecuarias" [En línea] En: www.magap.gov.ec
168. Miranda, J.E. (2011) Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, colocados en el interior y exterior de la planta de banano. Tesis Mag. Sci. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 101 p.
169. Monte Enrique (2001) Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology *Int. Microbiol* 4:1-4 DOI 10.1007/s1012301000001.
170. Montealegre J Santander C Herrera R Besoain X y Pérez LM. (2014) Utilización de microorganismos bioantagonistas para el control biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate. *Fitopatología* 37 (3):89-90.
171. Montero-Barrientos M, Hermosa R, Cardoza R, Gutiérrez S, Nicolás C and Monte E (2010) Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* *hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *Journal Plant Physiology*. 167: 659-665.
172. Mourichon X y RA Fullerton (1990) Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *Mycosphaerella fijiensis* (*Cercospora fijiensis*), respective agents of Sigatoka disease in banana and plantains, fruits. 45 (3): 213-218.
173. Muiño B. Botta E. Pérez E. Moreno D. y Fernández E. (2006) Uso de *Trichoderma* como alternativa al Bromuro de Metilo en los cultivos protegidos, flores y ornamental en Cuba. *Fitosanidad*. 10(2):179.
174. Mukherjee, P.; Verma, A.; Latha, J. (2012) PCR fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type culture collection-a need for reidentification of these economically importance fungi. *Science Correspondence*. 83 (4): 372-374.
175. Nakyanzi M (2002) Diseases threatening banana biodiversity in Uganda *African Crop Science Journal* (ISSN: 1021-9730) Vol 12 Num 1.
176. NCBI, *National Center for Biotechnology Information*: [En línea] En: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)
177. Nelson, E.B. Harman, G.E. (1997) Improved biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phase of turf diseases by use os spray applications. *Plant disease*.81:1132-1138.

178. Neves M V, do Nascimento R, Stecca A, Teles F, Ferreira E, Ornelas CA, Valle de Sousa M, Henning M, Ulhoa CJ (2010) New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Curr Microbiol* 61: 298–305
179. Orozco-Santos M, García-Mariscal K, Manzo-Sánchez G, Guzmán-González S, Martínez-Bolaños L, Beltrán-García M, Garrido-Ramírez E, Torres-Amezcu JA, Canto-Canché B (2013) La Sigatoka negra y su manejo integrado en banano. Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. 153 p.
180. Orozco-Santos M, Manzo-Sánchez G, Guzmán-González S, Martínez-Bolaños L y Canto-Canché B (2011) Management of diseased leaves with black Sigatoka to reduce the disease severity in banana Grand Nain. *Plant Disease* 101:133.
181. Orozco-Santos M, Orozco-Romero J, Pérez-Zamora O, Manzo-Sánchez G, Farias-Larios J y Da Silva Moraes W (2008) Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos. *Tropical Plant Pathology* 33(3): 186-196.
182. Páez Vásquez S y Barrientos Chacón J CH (2010) Mercadeo Agrícola en la zona atlántica de Costa Rica Corporación Bananera Nacional [En línea] En: <http://digecca.go.cr> (Consultado el 8/05/2010).
183. Papavizas G (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual review Phytopatology* 23. pp. 23-54.
184. Patiño LF, Bustamante RE y Salazar LM (2007) Efecto de sustratos foliares sobre la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (*Musa x paradisiaca* L.) y plátano (*Musa acuminata* Colla). *Agricultura Técnica (Chile)* 67(4): 437-445.
185. Perelló A, Mónaco C, Simón MR, Sisterna M, Dal Bello G. (2003) Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop Protection* 22:1089-1106.
186. Pérez Luis (2013) Strategies to reduce the use of agrochemicals in banana and plantain. XX Reunião Internacional da Associação para a Cooperação em Pesquisa e Desenvolvimento Integral das Musáceas (Bananas e Plátanos) 9 a 13 de setembro. Acorbat Brasil. Fortaleza, CE.
187. Pérez M y Echemendía C (1994) Effect antagonist of thirteen isolates of *Trichoderma* spp. against different pathogens of soil. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de la Habana. Conference. The AGRIS records dataset is maintained by FAO. The JAD LOD services are a collaboration project with the MIMOS Bhd.
188. Pérez M, Rebullido R, Pérez L. (2004) Líneas base de sensibilidad de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. de Cuba, a los fungicidas Azoxystrobin y Trifloxystrobin. *Fitosanidad* 8: 41-47.
189. Perrin, R., Anderson, J., Moscardi, E. (1987) La formulación de recomendación a partir de datos agronómicos: Un manual metodológico de evaluación económica. CIMMYT. México. pp. 79.
190. Pesántez M (2010) Sobrevivencia del Microorganismo *Trichoderma* spp. en suelos contaminados con petróleo Escuela Superior Politécnica de Chimborazo Facultad de Ciencias Tesis de Maestría Riobamba, Ecuador 145 pp.

191. Plaza GR, Upchurch R, Brigmon R, Whitman W y K Ulfig K (2004) Rapid DNA Extraction for Screening Soil Filamentous Fungi Using PCR Amplification. Polish Journal of Environmental Studies. 3: 315-318.
192. Pocasangre L, Sikora RA, Vilich V, Schuster RP (2000) Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of the burrowing nematode (*Radopholus similis*). InfoMusa 9: 3–5.
193. Portal Orelvis, Yovanny Izquierdo, David De Vleeschauwer, Aminaél Sánchez-Rodríguez, Milady Mendoza-Rodríguez, Mayra Acosta-Suárez, Bárbara Ocaña, Elio Jiménez, Monica Hofte (2011) Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*–banana interaction. Plant Cell Report 30 (5): 913-928.
194. Pro Ecuador (2013) Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones del Banco Central del Ecuador 57p.
195. Quiroga MA, Zapata SR, Mercado G, Hamles E, Villegas BV. (2006) Efecto de extractos vegetales en la inhibición del crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum*. Resúmenes XXIX Congreso Argentino de Horticultura. P. 81.
196. Rainforest Alliance (1998) Sustainable Agriculture. [En línea] En: www.rainforest-alliance.org
197. Rajesh Moses Jeyakumar Rajesh Leelavathy y Abachire Lakew Wondimu (2012) Optimization of Solid State Fermentation Conditions for the Production of Cellulase by Using *Trichoderma reesei*. European Journal of Applied Engineering and Scientific Research 1 (4):196-200
198. Ramírez G, Flores CR, Bejarano S, Rueda N, Rueda E. (2012) Aplicación combinada de micorrizas y *Trichoderma* en cultivo de melón. Resúmenes XXXV Congreso Argentino de Horticultura. P. 450.
199. Rhodes PL y Leach I (1964) A new banana disease in Fiji. Commonw. Phytopath. News, 10: 38-41.
200. Riddell, R.W., 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. Mycologia 42:265-270.
201. Rifai MA (1969) A revision of the genus *Trichoderma*. Mycology Paper 116:1–56
202. Rivas C. (1994) Pruebas de Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma sp.*, aislados de la zona de Chambo frente a *Fusarium spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Pythium spp*, y *Rhizoctonia spp*. Tesis de Grado de Ingeniero Agrónomo. ESPOCH.
203. Rivera Marta C. Eduardo R. Wrigth y Hermosa Rosa (2014) Control biológico de enfermedades de plantas en Argentina Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires 55 p.
204. Romero R, Sutton T (1997) Reaction of four *Musa* genotypes at three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. Plant disease 81: 1139-1142.
205. Romero R. A y T. B Sutton (1998) Characterization of Benomyl resistance in (*Mycosphaerella fijiensis*) cause of black sigatoka of banana, in Costa Rica. Plant disease 82: 931-934p

206. Samuels G, Petrini O, Kuhls K, Lieckfeldt, E. Kubicek C. (1998) The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. Stud. Mycol. 41:1-54.
207. Samuels GJ (1996) *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol Res 100:923–935
208. Samuels GJ, Chaverri P, Farr DF y McCray EB (2012) *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved November 5, from /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm
209. Samuels GJ, Ismaiel A, Petrini O. (2006). *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldiae*: two new *T. hamatum*-like species. Mycología 101 (1): 142-156.
210. Samuels GJ, Ismaiel A. Mulaw TB, Szakacs G, Druzhinina IS, Kubicek CP y Jaklitsch WM. (2012) The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. Fungal Diversity 55: 77-108.
211. Samuels GJ. (2006). *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. Mycological research. 100 (8): 923-935.
212. Sánchez-García Cynthia, Mileidy Cruz-Martín, Yelenys Alvarado-Capó, Luis Rojas, Michel Leiva-Mora, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque (2012) Detección y cuantificación de quitinasa en hojas de banano (*Musa* spp.) inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*. Biotecnología Vegetal Vol. 12, No. 2: 119 – 124.
213. Santos Adriana García Magda cotes Alba Marina y Villamizar Laura (2012) Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034 Revista Iberoamericana de Micología. 2012;29(3):150–156
214. Shaner E y Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow- mildewing resistance in Knox wheat. Phytopathology 67: 1051-1056.
215. Shuter A y Schmoll M (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied Microbiology and Biotechnology 87: 787-799.
216. Smith Alexander Camilo A. Beltrán Manabu Kusunoki Alba M. Cotes Keiichi Motohashi Takumasa Kondo Michihito Deguch (2013) Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary J Gen Plant Pathol 79:74–85
217. Srinivas, P. y G. Ramakrishnan (2002) Use of native microorganisms and commonly recommended fungicides in integrated management of rice seed borne pathogens. Annl. Pl.Protect. Sci., 10(2): 260-264.
218. Stefanova Marusia Nalimova (2007) Introducción y Eficacia Técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba Fitosanidad, vol. 11, núm. 3, septiembre,pp. 75-79.
219. Stefanova, M.; Sandoval, I. (1999) Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp. En el control de hongos fitopatógenos del suelo. CID-INISAV, Boletín Técnico. 2: 22p.

220. Stover RH (1988) Bananas. Tropical Agriculture Series. Longman, Harlow, UK.
221. Stover, RH (1972) Banana, Plantain and Abaca Diseases. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey, UK. 316 p.
222. Stover, RH (1976) Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spots. Tropical. Agriculture. (Trin.). 53: 111-114.
223. Stover, RH (1980) Sigatoka leaf spot of banana and plantains. Plant disease 4: 750-756.
224. Suárez-Castellá Miguel, Martín Iturrieta Luciano, Orellana Pedro, Triana Robín, Pérez Zaida, Mayelín Rodríguez, Agramonte Daniel, Sarría Zoe (2009) Procedimiento metodológico para la conformación, implementación y perfeccionamiento de sistemas de calidad para biofábricas Biotecnología Vegetal Vol. 9, No. 3: 141 – 152
225. Suquilanda M. (2001) Manual de Cultivos Orgánicos. Cuarta Edición.
226. Thangavelu R, Palaniswami A. y Velazhahan R (2004) Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana Agriculture, Ecosystems and Environment 103 259–263 Short communication.
227. Torres-Calzada, C. Tapia-Tussell, R. Quijano-Ramayo, A. Martin-Mex, R. Rojas-Herrera, R. Higuera-Ciapara, I. Perez-Brito, D. (2011) A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Colletotrichum capsici*. Molecular Biotechnology, Vol.49, No.1, pp. 48-55, ISSN 1073-6085.
228. Twizeyimana M, Ojiambo PS, Tenkouano A, Ikotun T y Bandyopadhyay R (2007) Rapid screening of *Musa* species for resistance to black leaf streak using *in vitro* plantlets in tubes and detached leaves. Plant Disease 91: 308-314.
229. Vargas gil S. Haro R. Oddino C. Kearney M. Zuza M. Marinelli A y March GJ. (2008) Crop management practices in the control of peanut diseases caused by soilborne fungi Crop Protection 27 (1): 1-9.
230. Vera, R., Moreno, B., Acevedo, R. y Trujillo, E. (2005) Caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp. por tipo de antagonismo y electroforesis de isoenzimas. Fitopatología. Venezuela. Vol. 18, No. 1.
231. Villalta R y Guzmán M (2005) Capacidad de esporulación de *Mycosphaerella fijiensis* en tejido foliar de banano depositado en el suelo y efecto anti-esporulante de la urea. CORBANA 31(58): 41-43.
232. Villalta R y Guzmán M (2008) Evaluación de Microorganismos Eficaces y *Trichoderma* como agentes de control biológico de la Sigatoka negra en banano (*Musa AAA*). Resumen preparado para el EM Festa Latin America, Universidad EARTH, Guácimo, Costa Rica.
233. Viterbo Ada, Ofir Ramot, Leonid Chernin, Ilan Chet (2002) Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie van Leeuwenhoek 81: 549–556.
234. Weindling R. (1932) *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi Phytopathology 22:837-845.

235. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols a guide to methods and applications, 315–322. Academic Press, San Diego.
236. Woo Sheridan L., Ruocco Michelina, Vinale Francesco, Nigro Marco, Marra Roberta, Lombardi Nadia, Pascale Alberto, Lanzuise Stefania, Manganiello Gelsomina y Lorito Matteo (2014) *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture The Open Mycology Journal, 8, (Suppl-1, M4) 71-126
237. Xia Xiaomin, Timothy K Lie, Xiaoming Qi, Zhonghui Zheng, Yaojian Huang y Yuemao Shen (2011) Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. Microbiology Ecologicistic 61: 619 – 625.
238. Young CS, Thomas JM, Parker SR y Paveley ND (2006) Relationship between leaf emergence and optimum spray timing for leaf blotch (*Rhynchosporium secalis*) control on winter barley. Plant Pathol. 55: 413–420.

Anexo 1. Procedencia de 100 cepas de *Trichoderma* spp.

Código	Localidad	Provincia
Ca 51-5a	Cajabamba	Chimborazo
Ca60-5(a)		
Ca9-2		
Ca38/1		
Ca50/1		
Ca51/2		
Ca56/5		
Ca60/2		
Ca60/3		
Ca51-1a		
Ca60/3		
lub-con 10		
Ca42-3		
Ca64-4		
Ca41-2a		
Ca72/8		
Ca106/4		
Ca4-1		
Ca61/5		
Ca 62-4		
Ca10a		
Ca56/1		
Ca60/5		
Ca61/2		
Ca62/4		
Ca69-1		
Ju42	San Juan	Chimborazo
Ju8		
Ju19		
Ju30		
Ju40		

Anexo 1. Procedencia de 100 cepas de *Trichoderma* spp. **Continuación.....**

Código	Localidad	Provincia
Ch17	Chambo	Chimborazo
Ch21		
Ch24-a		
Ch25		
Ch33		
Ch42		
Ch 29		
Ch22		
Ch2a		
Ch34		
Ch36		
Ch37		
Ch40		
Ch46 (c)		
Ch47		
Ch39		
Ch41		
Ch41 c		
Ch42		
Ch44		
Ch47		
Ch54		
Ch60		
Ch61		
Ch8 a		
Ch8 b		
Ch8b blanco		
Ch61		
Ch12		
Ch13		
Ch14		
Ch52		
Ch14		
Ch61		
Ch56		
Ch62		

Anexo 1. Procedencia de 100 cepas de *Trichoderma* spp. **Continuación.....**

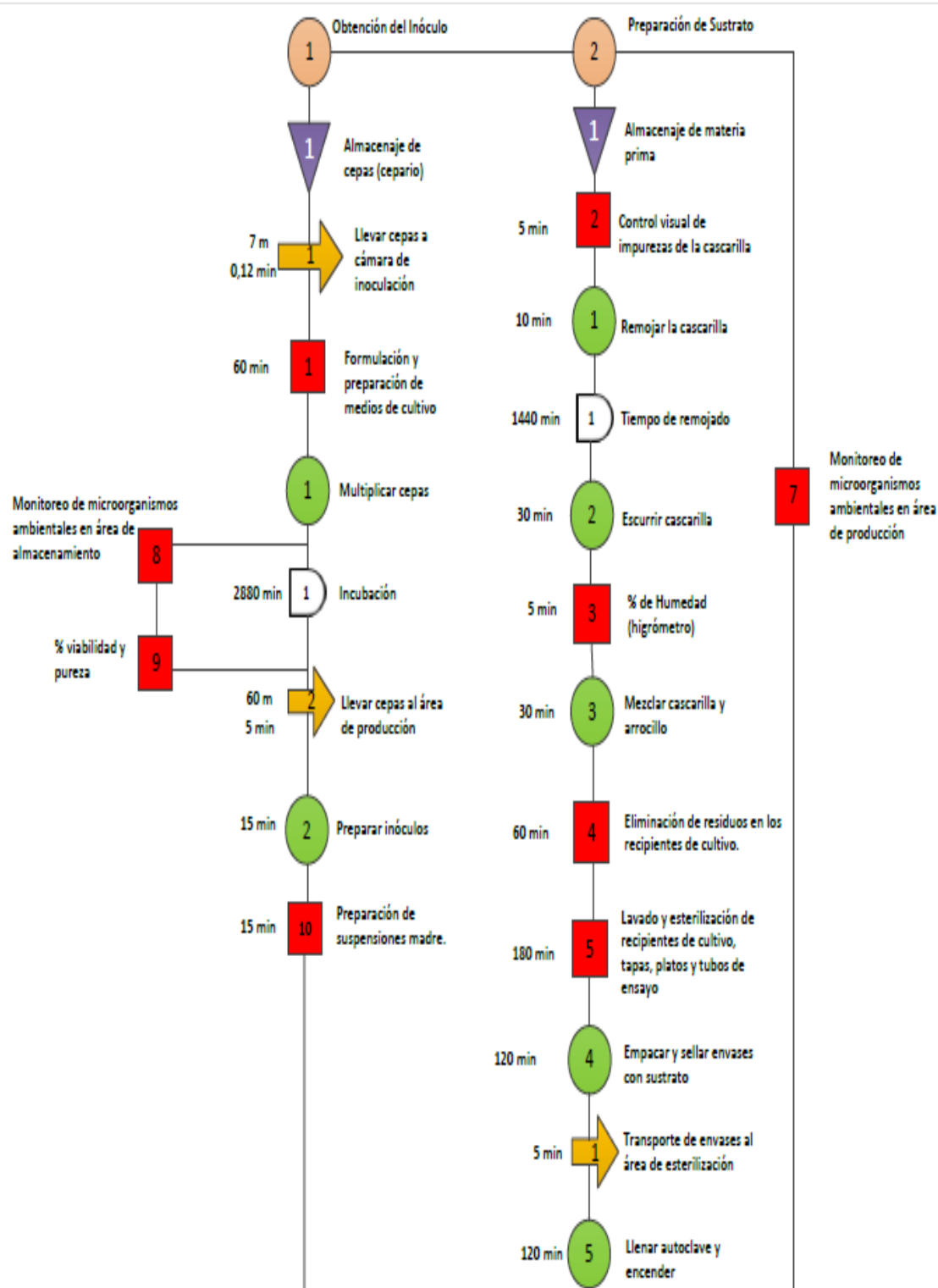
Código	Localidad	Provincia
M18	Buena Vista	El Oro
Tg	Pasaje	
Ju13	Puerto Inca	
T6	Pasaje	
T9	Santa Rosa	
T16	Tenguel	
T5	El Guabo	
T4	La Unión	
T14	La Victoria	
T18	El Cambio	
T10	Santa Rosa	
M11	Pasaje	
T3	Buena Vista	
T2	Machala	
T1	El Cambio	
T11	Pasaje	
T15	El Guabo	
T17	El Guabo	
T20	Pasaje	
T13	El Guabo	
M5	Auzurza	
M11a	Vía Pajonal	
M3	Ponce Enríquez	
M9	Salida a Machala	
Tj	El Guabo	
Tung	La Unión	
Ju27	Buena Vista	
T Pasaje	Buena Vista	
a36-3	Marcelino Maridueña	Guayas
TJM	Juján	Los Ríos
THSL	San Lorenzo	Esmeraldas
Tpsl	San Lorenzo	

Anexo 2. Secuencias de Consenso del análisis molecular de cepas de *Trichoderma* sp.

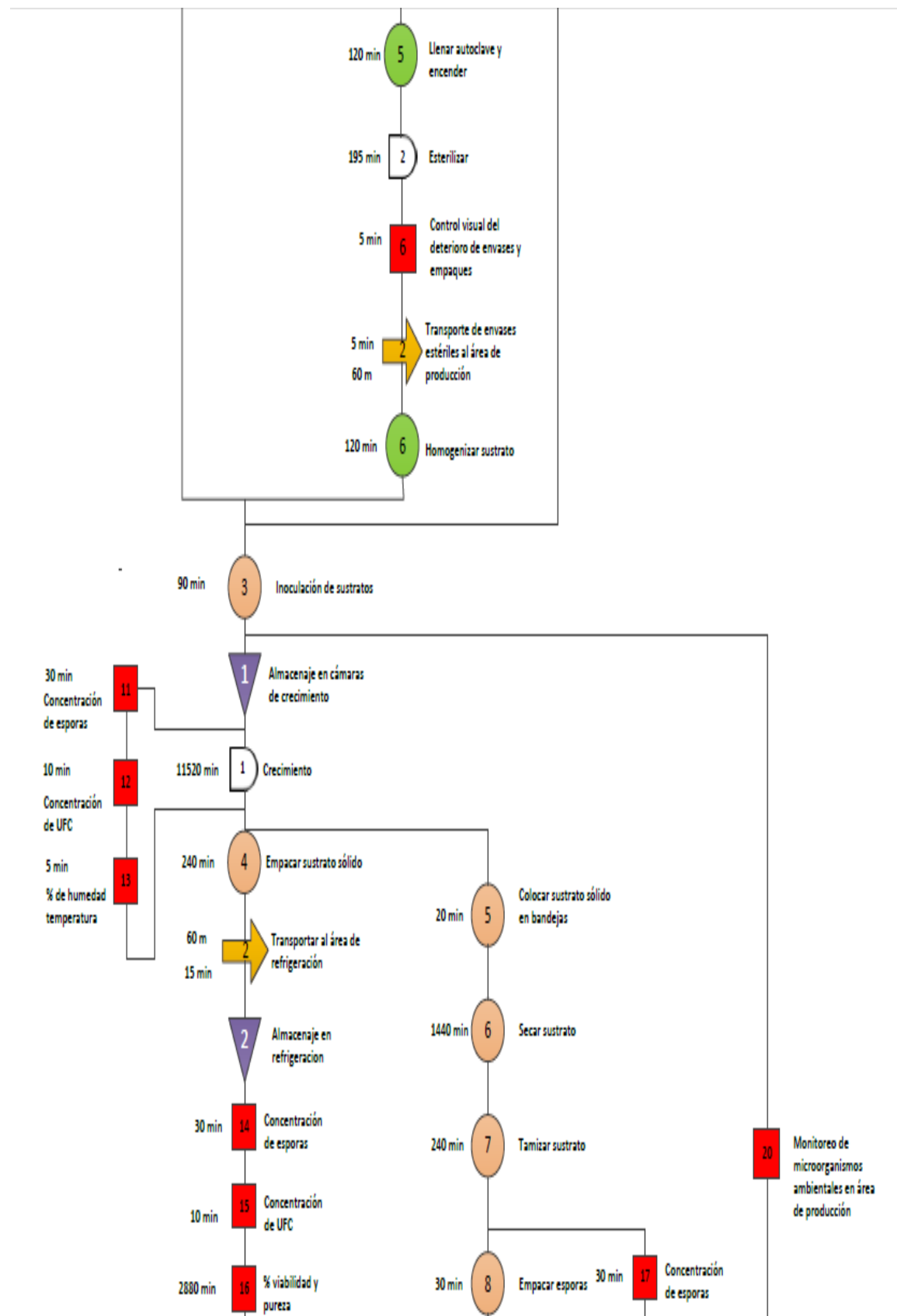
Resultados del análisis molecular de 10 cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelo de bananeras de la región Costa de Ecuador.

Muestra	Secuencia ITS 1 (PB)	Valor Q (%)	Secuencia ITS 4 (PB)	Valor Q (%)	Secuencia consenso (PB)
1	537	89,9	500	80,2	445
2	580	90,0	575	84,5	556
3	504	90,6	529	85,4	436
4	634	82,4	548	51,5	555
5	500	83,8	523	89,3	421
6	617	82,0	554	81,2	524
7	713	74,1	556	80,0	558
8	583	87,8	547	82,3	532
9	626	82,7	552	83,7	535
10	555	89,0	548	65,9	504

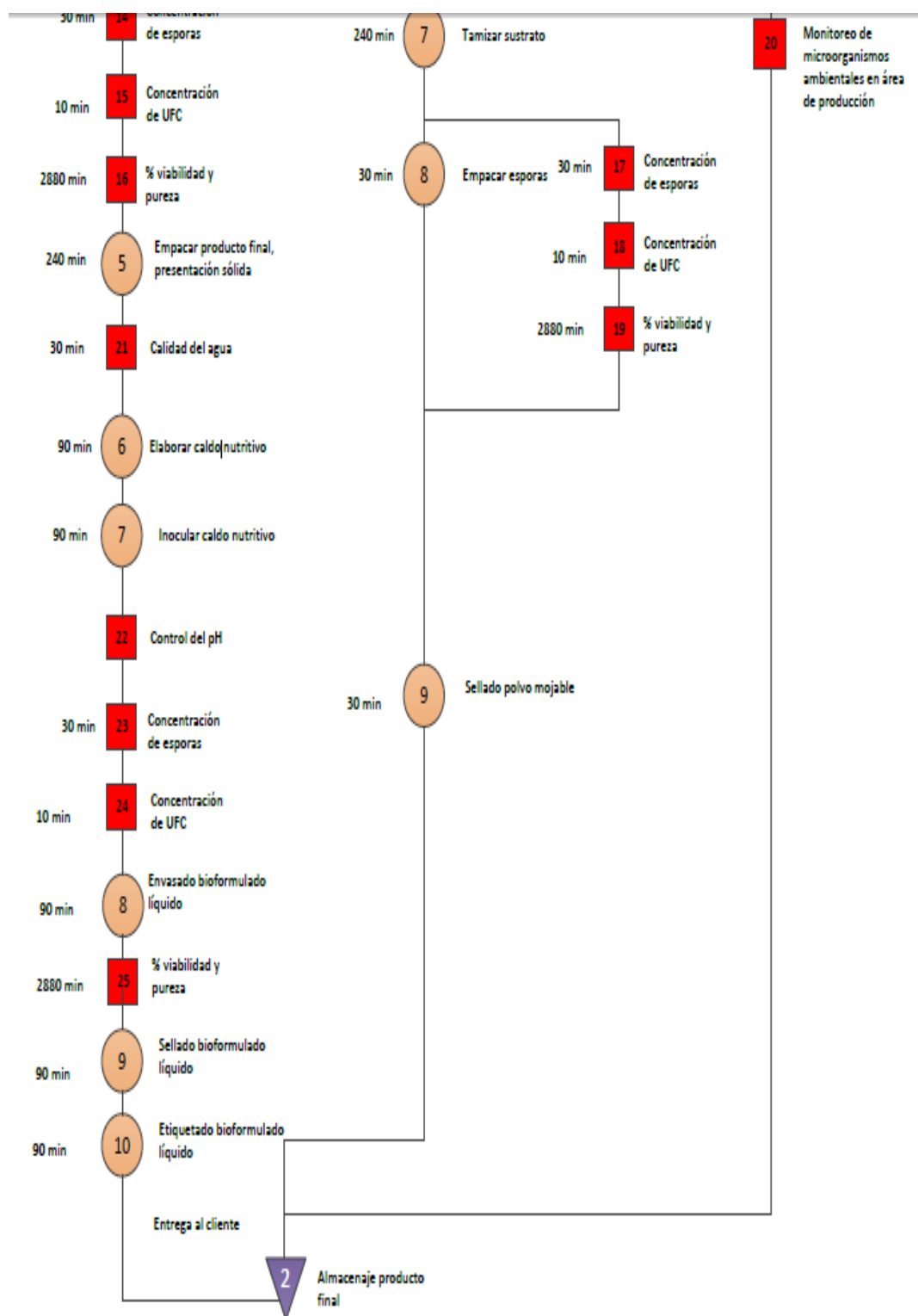
Anexo 3. Diagrama de Control de calidad de Bioformulado líquido



Anexo 3. Diagrama de Control de calidad de Bioformulado líquido **Continuación.....**



Anexo 3. Diagrama de Control de calidad de Bioformulado líquido Continuación.....



Anexo 4. Ventas del bioproducto Trikofun (2009-2014) a cuatro productoras/comercializadoras de banano en Ecuador.

