

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
SANTO DOMINGO

“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”

GRACE MARGOTH COBOS CANDO

INFORME TÉCNICO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

2010

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
SANTO DOMINGO

“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”

GRACE MARGOTH COBOS CANDO

INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA
AGROPECUARIA.

SANTO DOMINGO – ECUADOR
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”

GRACE MARGOTH COBOS CANDO

REVISADO Y APROBADO

MAYO. ESP. ING. RENÉ GONZÁLEZ V.
DIRECTOR DE CARRERA
DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Ing. Gustavo Núñez J. MSc.
DIRECTOR

Dr. Fredy Carrera G. MSc.
CODIRECTOR

Ing. Vinicio Uday P.
BIOMETRISTA

UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

“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”

GRACE MARGOTH COBOS CANDO

APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN DEL INFORME TÉCNICO.

	CALIFICACIÓN	FECHA
Ing. Gustavo Núñez J. MSc. DIRECTOR	_____	_____
Dr. Fredy Carrera G. MSc. CODIRECTOR	_____	_____

CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN ESTA UNIDAD.

UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres Margoth y Joel, mis hermanas Marielisa y Marianita, mi cuñado Gabriel, mis sobrinas Samantha y Sofía; mi papi Iganacio y mi abuelita Elisa.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer primero a Dios todo poderoso por darme la fuerza y la entereza para seguir adelante en la vida siempre con sus bendiciones, a mi mamita “Mi Dolorosita” por ser siempre mi guía y protectora.

A mi mamita bella Margoth por enseñarme con su ejemplo lo que significa valor, fuerza, amor y trabajo por siempre señalarme el camino correcto a seguir.

A mi papi Joel por ser paciente conmigo en mis arrebatos de locura y decirme constantemente que con ganas y coraje uno puede lograr lo que se propone.

A Marielisa por no ser solo mi hermana si no como mi mamá por ser mi compinche y ser mi ejemplo a seguir por ser mi modelo de paciencia, esfuerzo, sabiduría y amor.

A Marianita mi hermanita linda que con su inmenso corazón lleno de amor y dulzura ha sabido enseñarme persistentemente la fortaleza que uno lleva adentro.

A Gabriel por ser más que mi cuñado mi hermano mayor, por toda su comprensión de compartir con Marielisa más que la responsabilidad de hermanos, de padres también. Mil Gracias

A Samantha y Sofía a mis bellas sobrinitas por ser la alegría de mi corazón.

A Diego por estar junto a mí en los momentos que sentí abandonar la lucha, brindarme su fortaleza, paciencia, inteligencia, comprensión y dulzura, por compartir juntos momentos inolvidables.

Al Ing. Gustavo Núñez, mi director por ser más que el mentalizador del proyecto de mi tesis por tenerme en consideración para este proyecto y apoyarme para la realización del mismo; principalmente por sus oportunas y acertadas observaciones.

Al Dr. Fredy Carrera, mi codirector por su valiosa colaboración en este proyecto.

A mi querida “chinita” Andrea Ontaneda por ser mi hermana del alma por ser mi confidente y compañera de aventuras por brindarme su amistad sincera y compartir conmigo una amistad verdadera sin límites ni distancias

Al Coronel Patricio Jaramillo y a su esposa Gladys Pinto por ser siempre un apoyo muy importante en el transcurso no solo de vida estudiantil y profesional también en mi vida personal.

A la Dra. Soledad Benítez por brindarme su amistad, consejos, conocimientos y apoyo indispensable y valioso para la realización de esta investigación.

A mí querida ESPE y su Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias Santo Domingo, porque hicieron de mi vida universitaria una experiencia enriquecedora e inolvidable.

A los laboratorios de la Carrera de Biotecnología en especial a todo el personal del Laboratorio de Biotecnología Humana que me abrió sus puertas y me dio la oportunidad de realizar mi trabajo de tesis, brindándome apoyo y colaboración de principio a fin, en especial al Dr. Marcelo Grijalva, Ing. Paola Párraga, Ing. Oderay Andrade, Ing. Ma.E Terreros, Ing. Andrea Tamayo y el personal muy capacitado que labora dentro de el Cristina Albán, Gabriela Zapata, Gabriela Granja. Muchas Gracias.

A las Dras. Patricia Jiménez, Karina Proaño, a la Máster Mónica Jadán, por hacer de mi estancia y permanencia dentro de los laboratorios muy placentera gracias al cariño que siempre me han brindado.

A la Blga. Venus Arévalo, Ing. Paula Plaza, Katty Medina, Dra. Ximena Tapia y Dra. Sandra Naranjo por brindarme su cariño, amistad y consejos muy valiosos, por ser más que profesionales amigas.

A Omar Galárraga, Alfredo Santillán, Isabel Cevallos, Diego Pozo, Lourdes Torres, Antonio Bustamante, Isabel y Claudia Viracocha, Camilo Muñoz, Mercedes Charpentier, Oscar Lascano, por inyectarme esa alegría y sencillez que les caracteriza por no solo compartir aulas, habitación o internado si no experiencias de vida para enriquecer siempre el espíritu y fortalecer el alma.

A mis amigos David Dávila, Ma.José Basantes, Cristian Peña por demostrarme siempre su solidaridad, sinceridad y compañía en aquellos momentos de tristezas, alegrías y esperanzas por enseñarme con su manera de ser que siempre va existir una eterna complicidad; a Patricia Albarracín, Alejandra Rivera, Alberto Roura, Andrea Arcos, Lorena Oña del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

AUTORIA

Todos los criterios emitidos en la presente investigación, son de absoluta responsabilidad del autor.

Grace Cobos Cando

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. LA ENFERMEDAD DE SIGATOKA NEGRA EN BANANO.....	5
2.1.1. Agente Causal.....	5
2.1.2. Sintomatología.....	6
2.1.3. Manejo de la Enfermedad.....	7
2.1.3.1. Fungicidas.....	7
2.1.3.2. Cultivares resistentes.....	7
2.1.3.3. Manejo del cultivo.....	8
2.1.3.4. Control Biológico.....	8
2.1.4. Impacto Económico.....	9
2.2. EL CONTROL BIOLÓGICO.....	10
2.3. TRICHODERMA.....	11
2.3.1. Importancia del Género Trichoderma en la Agricultura.....	13
2.3.1.1. Hongos y Enfermedades que controla Trichoderma.....	14
2.3.1.2. Mecanismos de Acción.....	16
2.3.1.2.1. Antibiosis.....	16
2.3.1.2.2. Micoparasitismo.....	16
2.3.1.2.3. Competencia.....	17
2.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA HONGOS.....	17
2.4.1. Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR).....	18
2.4.2. Estructura del Ribosoma.....	20

2.4.2.1.	Región Espaciadora Transcriptora Interna (ITS) del ADN Ribosomal (rDNA)	20
2.4.2.2.	Secuenciación Automática de ADN	22
2.4.2.3.	Filogenia Molecular	23
2.4.2.3.1.	Programas Informáticos BLAST y CLUSTAW	25
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1.	UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN	26
3.1.1.	Ubicación Política	26
3.1.2.	Ubicación Geográfica	27
3.1.3.	Ubicación Ecológica	27
3.2.	MATERIALES	28
3.2.1.	Materiales de la Fase de Laboratorio	28
3.2.1.1.	Equipos	28
3.2.1.2.	Sustancias y reactivos	29
3.2.1.3.	Materiales de acero, vidrio y otros	30
3.2.1.4.	Materiales de Oficina y toma de información	32
3.3.	MÉTODOS	32
3.3.1.	Diseño Experimental	32
3.3.1.1.	Factores a probar	32
3.3.1.2.	Tratamientos a comparar	33
3.3.1.3.	Repeticiones o bloques	33
3.3.1.4.	Características de la unidad experimental	34
3.3.1.5.	Análisis Estadístico	34
	Variable a Medir	34
3.3.2.	Métodos Específicos de Manejo del Experimento	35
3.3.2.1.	Localidades Muestreadas	35
3.3.2.2.	Obtención del Agente Patógeno <i>Paracercospora fijiensis</i>	35
3.3.2.3.	Identificación del Agente Patógeno <i>Paracercospora fijiensis</i>	37
3.3.2.4.	Obtención del Antagonista <i>Trichoderma</i> spp.	37
3.3.2.5.	Identificación del Antagonista <i>Trichoderma</i> spp.	38
3.3.2.5.1.	Extracción de ADN de cepas de <i>Trichoderma</i> spp.	38
3.3.2.5.2.	Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR)	38
3.3.2.5.3.	Análisis de Secuencias	39
3.3.2.6.	Determinación del antagonismo de <i>Trichoderma</i> en contra de <i>Paracercospora fijiensis</i>	39

IV.	RESULTADOS	41
4.1.	IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO	41
4.2.	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL CONTROLADOR	
	Trichoderma spp.	42
4.2.1.	Identificación Molecular de las Cepas Nativas de Trichoderma spp. Seleccionadas	43
4.2.1.1.	Extracción y amplificación de ADN de cepas de Trichoderma spp.	43
4.2.1.2.	Resultados de la Secuenciación.....	44
4.3.	ENSAYO DE ACCIÓN INHIBITORIA	48
V.	DISCUSIÓN	52
VI.	CONCLUSIONES	55
VII.	RECOMENDACIONES	56
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	57
IX.	RESUMEN	68
X.	SUMMARY.....	69
XI.	ANEXOS	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diferentes especies de fitopatógenos controlados por <i>Trichoderma</i>	15
Cuadro 2. Situación política del área de investigación.....	26
Cuadro 3. Situación geográfica del área de la investigación	27
Cuadro 4. Características agroclimáticas de la zona de Laboratorio.....	27
Cuadro 5. Esquema de los tratamientos del ensayo de Acción Inhibitoria “ <i>in vitro</i> ”	33
Cuadro 6. Modelo de la ecuación lineal	34
Cuadro 7. Comparación de cepas colectadas de <i>Trichoderma</i> con especies de <i>Trichoderma</i> almacenadas en el BLAST.....	45
Cuadro 8. Regresión y Correlación entre el tiempo de evaluación en días y el crecimiento radial en mm de cada cepa de <i>Trichoderma spp.</i> , en la prueba de antagonismo de laboratorio en contra de <i>Paracercopsora fijiensis</i>	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Región Espaciadora Transcritora Interna (ITS)	21
Figura 2. Representación de Secuenciación automática.....	23
Figura 3. Representación esquemática de un árbol filogenético. A, B, C y D representan a organismos en estudio (adaptación de Berbee y Taylor, 1999).....	24
Figura 4. Mapa del Ecuador	26
Figura 5. Mapa de Santo Domingo	27
Figura 6. Croquis del sitio.....	27
Figura 7. Desarrollo de <i>Paracercopora fijiensis</i> en medio de cultivo PDA.....	41
Figura 8. <i>Trichoderma</i> . a) conidióforos; b) conidios	42
Figura 9. Bandas de ADN amplificadas.....	44
Figura 10. Árbol filogenético de las cepas obtenidas de las localidades en estudio.....	47
Figura 11. Cepas de <i>Trichoderma spp.</i> pertenecientes a las localidades de Paisaje, Machala y Bonanza	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de la captura y aislamiento de hongos en estudio	70
Anexo 2. Medio selectivo para captura de <i>Trichoderma spp.</i>	71
Anexo 3. Metodologías de extracción de ADN.....	72
Anexo 4. Metodología aplicada para la realización de los Geles de Agarosa en Electroforesis	75
Anexo 5. Protocolo empleado para Reacción de la Cadena de Polimerasa.....	77
Anexo 6. Codificación de las cepas de <i>Trichoderma spp.</i> aisladas	78
Anexo 7. Corridas de gel de agarosa con muestras de extracción de ADN	79
Anexo 8. Procedimientos para identificación de muestras usando programas bioinformáticos.....	80

I. INTRODUCCIÓN

En Ecuador, el cultivo de banano es de gran importancia, desde la perspectiva del propio sector, la producción de banano contribuye con un 3% en la generación del PIB total, es decir unos 593 millones de dólares, y con el 16% del PIB generado en el sector agropecuario (Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador 2006).

Debido a que en el Ecuador el banano es uno de los cultivos de mayor importancia económica, social y nutricional, la actividad bananera, incluyendo todo el proceso de producción, comercialización y exportación constituye una de las mayores fuentes de empleo: un 12% de la población depende directa o indirectamente de este sector y ha desarrollado una industria verticalmente integrada. (CORPEI, 2007).

El principal problema fitopatológico en el cultivo de banano en América Central, Colombia y Ecuador, así como de muchas regiones de Asia y África, es la Sigatoka negra, enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Marín y Romero, 2002), cuya forma imperfecta corresponde a *Paracercospora fijiensis* Morelet (Rivas-Platero, *et al.*, 2002).

Esta enfermedad ataca las hojas del cultivo de banano, produciendo un rápido deterioro del área foliar, afectando el crecimiento y la productividad de las plantas al disminuir la capacidad fotosintética de las mismas. Adicionalmente reduce la calidad

de la fruta al promover la maduración prematura de los racimos que es la mayor causa de pérdidas debido a ésta enfermedad, por tal motivo se ha venido efectuando fumigaciones aéreas y terrestres con una amplia gama de fungicidas en una frecuencia de 24 ciclos/año. (Rivas-Platero, *et al.*, 2002).

Esta situación ha provocado que se tengan que buscar medidas alternas y disminuir así el uso de plaguicidas, por lo que la tendencia actual se dirige a la búsqueda de microorganismos que pueden ser usados como agentes de biocontrol (Michel, 2001). El control biológico busca aparte del control, lograr la seguridad alimentaria al adquirir alimentos libres de compuestos tóxicos y llevar una vida sana. Para esto es necesario conocer a los agentes benéficos, aprender sus hábitos e identificar el papel que juegan para regular a las poblaciones dañinas y reducir así el uso de plaguicidas. Esto obliga a realizar esfuerzos para desarrollar cada vez más productos a base de organismos antagonistas, que actúan contra patógenos de enfermedades foliares. En este sentido se han logrado resultados satisfactorios de control biológico de fitopatógenos con especies del género *Trichoderma* en un rango amplio de enfermedades del follaje, aún cuando haya epidemias explosivas (Nelson, 1991).

El uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol representa una alternativa viable a ser evaluada, dadas sus características de ser eficaz contra fitopatógenos foliares y del suelo en algunos cultivos. Así mismo, se requiere detectar la presencia y diversidad de cepas nativas, con el propósito de evaluarlas como agentes potenciales de control biológico (Papavizas, 1985 Citado por Ezziyyani, 2004). Las

especies de *Trichoderma* muestran gran capacidad para el control de fitopatógenos ejerciendo un efecto antagónico, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, su crecimiento rápido en un gran número de sustratos ya que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al. 1982. Citado por Ezziyyani, 2004).

El hongo *Trichoderma* actúa por medio de la competencia por sustrato, la producción de sustancias fungotóxicas, la inducción de resistencia por medio de fitoalexinas, y el micoparasitismo.

Por lo expuesto anteriormente, la presente tesis representa una opción al control químico en el manejo integrado de la enfermedad, el cual se constituye en una herramienta que proporciona el fundamento para efectuar un manejo preventivo de la Sigatoka negra, basado en la implementación de una alternativa biológica usando a *Trichoderma spp.*

Para cumplir con la investigación, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

- Evaluar el potencial antagónico de cepas nativas de *Trichoderma spp.* para el control de *Mycosphaerella fijiensis*; (anamorfo *Paracercospora fijiensis*) en el cultivo de banano en la fase de laboratorio.

Objetivos Específicos

- Aislar el agente patógeno causante de la enfermedad.
- Aislar, seleccionar y caracterizar molecularmente las cepas nativas de *Trichoderma*.
- Evaluar la actividad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* en contra de *Paracercospora fijiensis* (Patógeno en estadio juvenil).
- Difundir la metodología y los resultados relevantes del trabajo de investigación a nivel interno.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LA ENFERMEDAD DE SIGATOKA NEGRA EN BANANO

La Sigatoka negra se describió como una enfermedad nueva en 1963, en América Latina se observó por primera vez en Honduras en 1972 y desde allí se diseminó por el resto de la región. En Suramérica, se registró por primera vez en Colombia en 1981, posteriormente en Ecuador en 1987 (Haddad, *et al.* 1999). Constituye uno de los principales problemas fitopatológicos de la producción de banano ya que por la severidad de su incidencia ocasiona bajos o ningún rendimiento y altos costos por las características de su combate, llegando a causar pérdidas en la producción de entre el 60 y 70%.

En nuestro país se la detectó por primera vez en la hacienda “El Timbre” localizada en la provincia de Esmeraldas, en la actualidad se ha extendido al 50% de todas las áreas bananeras del Ecuador que son aproximadamente 120 mil hectáreas su presencia incluso se encuentra en pequeñas áreas cultivadas en la provincia insular de Galápagos (Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador A.E.B.E, 2006)

2.1.1. Agente Causal

El agente causal de la enfermedad de la Sigatoka Negra es el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Paracercospora fijiensis* Morelet Deighton, Zimm) que afecta a todas las variedades de banano (Aguirre *et al.* 2003).

La Sigatoka Negra ocasiona severos daños al follaje de la planta destruyendo su capacidad fotosintética y de respiración, reduciendo con ello el rendimiento y calidad de la fruta y si el ataque se origina sobre todo en las hojas jóvenes de la planta, la pérdida de la producción es total. La fruta que se ha obtenido de plantaciones atacadas por este mal se madura rápidamente en el trayecto a los mercados con las consiguientes pérdidas para los agroexportadores (Suquilanda, 2001).

2.1.2. Sintomatología

Los síntomas que presentan las plantas afectadas por *Mycosphaerella fijiensis* son puntos de color café rojizos de 0,25 mm de diámetro que aparecen en el envés de la hoja y a continuación estrías de color café rojizo de 20 mm de largo por 2 mm de ancho que se encuentran de forma paralela a la venación lateral en el envés de la hoja, luego las estrías se tornan de café oscuro a casi negro un poco más alargadas y son visibles en el haz de la hoja (Manzo, 2001).

La estría sigue avanzando en su desarrollo y evolución y se hace más grande y ancha de forma elíptica y se rodea de un borde café oscuro visible cuando la hoja está mojada; luego de este estado la mancha se seca en el centro, se torna gris y se deprime, la lesión se rodea de un borde angosto negro bien definido al unirse todas las lesiones la hoja se torna negra y muere en 3 ó 4 semanas después de asomar los primeros síntomas (Agrios, 2000).

2.1.3. Manejo de la Enfermedad

A nivel del Ecuador existen varias técnicas de manejo para la enfermedad de la Sigatoka Negra son las siguientes:

2.1.3.1. Fungicidas

Las plantaciones grandes utilizan principalmente controles químicos. Los programas de control están en su mayor parte basados en los fungicidas protectores 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 benzimidazol, IDM y estrobilurinas es muy común en muchas áreas de producción. Los fungicidas frecuentemente son aplicados en fumigaciones aéreas (Guzmán, 2004).

2.1.3.2. Cultivares resistentes

Soto (1993), manifiesta que el uso de cultivares resistentes constituye en efecto el único medio práctico de controlar la Sigatoka negra para el pequeño agricultor porque los fungicidas en general son muy caros para ellos. Desgraciadamente aunque existen cultivares resistentes de plátano y banano disponibles, muchas veces son inaceptables a 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.

2.1.3.3. Manejo del cultivo

Las técnicas de manejo como el espaciamiento de las plantas, drenaje de agua, areación del suelo, remoción de malezas y eliminación de las hojas o parte de ellas que están severamente enfermas, también pueden ser usadas para el manejo y control de la enfermedad. Simplemente quitar las hojas infectadas (deshojar) y ponerlas en el suelo puede reducir la eficacia de emisión de las ascosporas significativamente. La aplicación de urea y otros productos a los residuos infestados en el suelo puede acelerar la descomposición de éstas y así reducir más la fuente de inóculo (Soto, 1993).

2.1.3.4. Control Biológico

Suquilanda (2001), manifiesta que investigaciones dirigidas al desarrollo de métodos de control biológico para la Sigatoka negra han sido limitadas porque los controles químicos que son altamente efectivos y económicos, están ampliamente disponibles a los productores comerciales. Aunque los métodos de control biológico son deseables principalmente para la protección del ambiente, su aplicación con éxito probablemente será difícil porque la Sigatoka negra es una enfermedad policíclica y el tejido susceptible del bananero está presente todo el año. Se han probado varias

bacterias epifíticas (incluyendo *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia* spp.) para el control de *M. fijiensis*, pero aún la investigación del control biológico está en sus etapas preliminares.

Existe un grupo importante de hongos que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales (Orietta y Larrea, 2001).

Entre los microorganismos más importantes se encuentran hongos de los géneros *Gliocladium* y *Trichoderma*. Este último es el más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos del suelo. El mecanismo de acción principal de *Trichoderma* es por hiperparasitismo, aunque algunas especies y cepas pueden producir metabolitos bioactivos que incrementan su acción. Además algunos aislamientos controlan nemátodos (Orietta y Larrea, 2001).

2.1.4. Impacto Económico

El banano ha sido por décadas el principal rubro de exportación del Ecuador, sin embargo los crecientes problemas en su comercialización originan protestas y reclamos masivos, ya que de la actividad bananera dependen unas 300 mil familias. Esta fruta mantiene después del petróleo el primer puesto de los rubros exportados del país, que fue su mayor productor y exportador en el mundo. Lo preocupante es que, a pesar de que la producción se recupera, la decadencia de esta actividad se mantiene.

Recuérdese que, aun cuando en 2002 la producción aumentó en 4%, sus ventas no alcanzaron el nivel previo al fenómeno del Niño.

2.2. EL CONTROL BIOLÓGICO

Zerba (2007), manifiesta que el término Control Biológico se refiere por un lado, al fenómeno natural que consiste en la regulación del número de plantas y animales por medio de enemigos naturales (parásitos, predadores y patógenos); por otro lado, al control aplicado de plagas; técnica que incluye la manipulación de esos agentes naturales por el hombre para reducir las pérdidas en agricultura, forestación o productos comerciales.

El control biológico aplicado generalmente se implementa de tres formas diferentes o combinaciones de las mismas:

Conservativo: Consiste en alterar las prácticas culturales en los cultivos para favorecer el desarrollo de los agentes de control biológico natural y sus efectos.

Aumentativo: Los agentes de control biológico se producen en forma masiva en el laboratorio y se aplican en forma inoculativa o inundativa para destruir las plagas.

Clásico: Es la fase de aplicación compuesta por el descubrimiento, importación y establecimiento de enemigos naturales exóticos.

El control biológico está libre de los efectos secundarios indeseables asociados a los insecticidas de amplio espectro y es uno de los métodos de mejor relación entre costo y efectividad. Cuando es aplicado por especialistas, bajo principios establecidos, el control biológico es seguro y no tiene efectos adversos sobre el ecosistema (Cate, 1994 citado por Zerba, 2007).

2.3. TRICHODERMA

Trichoderma es un tipo de hongo anaerobio facultativo, actualmente la clasificación taxonómica lo ubica dentro del Dominio Eucarya, Reino Fungi, División Mycota, Sub división Eumycota, Clase Deuteromicetes, Orden Moniliales, Familia Moniliaceae, Género *Trichoderma*.

Su fase perfecta (estado Telomorfo) lo ubica en la Clase Ascomycetes, Serie Pyrenomycetes, Orden Hipocreales, Género *Hypocrea*. Tiene como sinónimos el género *Tolypocladium* (Villegas, 2000)

Trichoderma se caracterizan por no poseer o no presentar un estado sexual determinado. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas (Páez, 2006).

Trichoderma, constituye un modelo excepcional, y para muchos autores se trata de un biocontrolador “ejemplo” para el estudio de biocontrol, en primer lugar por tratarse de un microorganismo ubicuo, fácilmente cultivable en diferentes medios de

cultivos, de crecimiento rápido en varios sustratos y huéspedes, es raramente patogénico en plantas superiores, actúa como micoparásito y es buen competidor por fuentes nutritivas, produce antibióticos y un sistema enzimático capaz de atacar a una amplia gama de fitopatógenos (Falconí, 1997).

Trichoderma, es injustamente considerado sólo como antagonista de hongos, ha sido reportado con buenos resultados como antagonista de patógenos bacterianos, ha sido estudiado intensamente por sus propiedades antibióticas y su sistema enzimático en el proceso de alimento y en la biodegradación, como bioindicador (Falconí, 1997).

Trichoderma ha merecido la atención máxima como agente de biocontrol a una respuesta positiva y concreta a la campaña mundial de limpieza del planeta mediante la utilización de microorganismos antagónicos competitivos para la protección de los cultivos de los patógenos fúngicos del suelo.

Desde luego no es posible esperar un buen control por *Trichoderma* en campos con antecedentes a favor del patógeno fúngico. Esto fue claramente demostrado también en el cultivo del tabaco, las aplicaciones biológicas dirigidas a suelos con infección media y alta por *P. nicotianae* solamente reducen el índice de infección a un 30 % y a un 60 % respectivamente (Trujillo,*et al.* 1996).

2.3.1. Importancia del Género *Trichoderma* en la Agricultura

El principal beneficio de *Trichoderma* para la agricultura, es el antagonismo con 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 antifungales 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 (Villegas, 2000)

El manejo de las plantas mediante la rotación de cultivos favorece a *Trichoderma* a librar el suelo de los propágulos del patógeno vulnerables durante su latencia en ausencia del hospedante, por esta razón la utilización del biopreparado en los cultivos a rotar en las áreas altamente infectadas será una forma a contribuir en la reducción de la población del patógeno en un menor plazo de tiempo (Acevedo, 1995).

Además la preparación adecuada del terreno, la mejor fecha de plantación, fertilización y riego actúan a favor de la combinación planta-*Trichoderma* asociadas. La introducción del biocontrol por *Trichoderma* en el manejo integrado de plagas por cultivo es la forma óptima de explotar las posibilidades que brinda el microorganismo como antagonista. El análisis riguroso de los antecedentes y el nivel de inóculo en el

suelo ayuda a la toma de decisiones con vistas a proporcionar un control eficiente y optimizar la efectividad de *Trichoderma* (Orietta, 2001).

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen enfermedades. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas (Orietta, 2001).

2.3.1.1. Hongos y Enfermedades que controla *Trichoderma*

El género *Trichoderma* posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros (Ezziyyani et al., 2004).

Diferentes especies de *Trichoderma* tienen la capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fs *dianthii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Sclerotium rolfsii*, *Rosellinia bunodes*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum* con *Trichoderma harzianum*, *Botrytis cinerea* con *T. virens*, *Rosellinia bunodes* con *T. pseudokoningii*, *Armillaria mellea* con *T. viride*, *Pythium* sp. y *Phytophthora* sp. con *T. hamatum*, *Cryptonectria parasitica* con *T. parceromosum*. (Fuentes et al. 2001)

En el Cuadro 1 se indica las diferentes especies de hongos fitopatógenos controlados por *Trichoderma*.

Cuadro 1. Diferentes especies de fitopatógenos controlados por *Trichoderma*

Fitopatógenos controlados por <i>Trichoderma</i>	Enfermedad	Cultivo	Especie de <i>Trichoderma</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	Papa, tomate, fríjol, fresa, flores, tomate.	<i>T. harzianum</i> <i>T. koniingii</i> <i>T. pseudokonigii</i> <i>T. aureoviride</i> <i>T. viride</i>
<i>Fusarium moniliforme</i>	Pudrición	Maíz	<i>T. harzianum</i> <i>T. virens</i> , <i>T. longibranchiatum</i>
<i>Phytophthora infestans</i>	Gota	Papa, pepino de agua	<i>T. asperellum</i> <i>T. harzianum</i>
<i>Phytophthora spp.</i>	Pudrición	Tabaco, flores, frutales, etc.	<i>T. harzianum</i> <i>T. aureoviride</i> <i>T. longibranchiatum</i>
<i>Pythium spp.</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Varios cultivos.	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i> <i>T. longibranchiatum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitamientos vasculares	Papa, tomate, fríjol, plátano, maíz, clavel.	<i>T. harzianum</i> <i>T. koniingii</i> <i>T. lignorum</i> <i>T. aureoviride</i>
<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición algodonosa, volcamiento	Zanahoria, tomate, lechuga, col, café, papa, cebolla, ajo, pimentón.	<i>T. harzianum</i> <i>T. koniingii</i> <i>T. pseudokonigii</i> <i>T. virens</i> <i>T. viride</i> <i>T. hamatum</i> <i>T. longibranchiatum</i>
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Carbón de las raíces.	Maíz, fríjol, melón, ajonjolí.	<i>T. harzianum</i> <i>T. koniingii</i> <i>T. longibranchiatum</i> <i>T. crassum</i>

Fuente: Adaptado de: Herrera-Estrella y Carsolio, 1998 y Chet and Inbar, 1994. Citado por Páez, 2006, modificado por Cobos, 2009

2.3.1.2. Mecanismos de Acción

Los mecanismos antagónicos que utiliza *Trichoderma sp.* se describe como antibiosis, micoparasitismo y competencia, sin ser estos mutuamente excluyentes y pudiendo por lo tanto actuar a la vez (Dubos, 1987).

2.3.1.2.1. Antibiosis

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 (Howell, 1993).

2.3.1.2.2. Micoparasitismo

Existen cuatro estados de parasitismo en la relación antagónica de *Trichoderma sp.* con otros hongos (Erazo, 2007):

- Crecimiento quimiotrófico: El estímulo químico proviene del hongo objeto de control.
- Reconocimiento específico: Probablemente mediado por lecitinas sobre la superficie celular, tanto del hongo antagónico como del patógeno.
- Unión y crecimiento de las hifas alrededor del patógeno.

- Secreción de enzimas líticas que degradan las paredes celulares del hongo fitopatógeno.

2.3.1.2.3. Competencia

Si el crecimiento del antagonista provoca la reducción de la población del patógeno, la competencia entre estos puede resultar en control de la enfermedad (Erazo, 2007).

2.4. TÉCNICAS MOLECULARES PARA HONGOS

Con el descubrimiento en 1986 de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como una de las mayores técnicas moleculares ha permitido establecer la identidad de cada organismo y sus relaciones filogenéticas, lo que ha revolucionado la sistemática de hongos sobre todo los que sirven de controladores, debido a que la determinación tradicional basada en la observación de estructuras morfológicas y en propiedades fisiológicas no es suficiente para obtener una identificación confiable. Con la utilización de las técnicas moleculares nos ha facilitado la identificación en el menor tiempo posible y de una forma fiable de organismos patógenos que es fundamental para minimizar los daños que producen (EDEL, 1998).

Las aplicaciones de la técnica PCR son muy amplias entre las más usadas para el campo agropecuario se encuentra la detección e identificación de virus, bacterias,

hongos, nematodos, etc. (CENIS, 1993). El éxito de esta técnica consiste en su sencillez teórica y en la rapidez en su ejecución, ya que permite la identificación de un microorganismo en el menor tiempo.

2.4.1. Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, que permite la síntesis *in vitro* de ADN (Barrera y Rodríguez, 2004). Esto se consigue mediante la repetición cíclica de reacciones enzimáticas a diferentes temperaturas.

Estas reacciones permiten la replicación exponencial del ADN gracias a enzimas como la ADN polimerasa (Treguerres et al., 2003). La PCR consiste en tres pasos

- a) *Desnaturalización*: radica en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para así separarlo en dos cadenas sencillas que servirán como molde para la amplificación. Para ello se incubaba a temperaturas entre 92 y 95°C (Barrera y Rodríguez, 2004).
- b) *Hibridación*: dos tipos de moléculas cebadoras cuyas secuencias son complementarias a los extremos de la secuencia a amplificar en el ADN, hibridan específicamente con las secuencias del ADN molde, a una temperatura que facilite el apareamiento de bases. Esta temperatura de

hibridación depende del contenido de G y C de los cebadores y generalmente oscila entre 50 y 60°C (Treguerres et al., 2003).

- c) *Extensión*: La ADN polimerasa termoresistente sintetiza una cadena complementaria por cada cadena molde, adicionando nucleótidos al extremo 3' del cebador hibridado. Este paso se efectúa a 72°C cuando se usa Taq Polimerasa. Al final del proceso de extensión se generan dos nuevas moléculas de ADN de cadena doble idénticas a la secuencia original amplificada (Surzycki, 2000).

El número de ciclos en una PCR varía entre 20 y 45 resultando en una acumulación del fragmento de ADN. En teoría después de 30 ciclos de amplificación se obtendrían 1.000 millones de copias, cantidad suficiente para ser visualizado por electroforesis y cuantificado por espectrofotometría. Las reacciones de PCR se realizan automáticamente en termocicladores (Treguerres *et al.*, 2003).

Con la ayuda de las reacciones de PCR se trata de estudiar los cambios en la secuencia de los genes y de ahí inferir una relación evolutiva, para lo cual el RNA ribosómico tiene un interés muy grande porque sirve como marcador para hacer filogenia de organismos.

2.4.2. Estructura del Ribosoma

Los ribosomas son organelos donde se sintetizan proteínas. Los ribosomas no están rodeados por una membrana; están constituidos por dos subunidades, cada una de las cuales está formada por un complejo de RNA ribosómico y proteínas. Tanto en las células procarióticas como en las eucarióticas, los ribosomas tienen una estructura similar; sin embargo, los ribosomas de las células eucarióticas son un poco más grandes. Los ribosomas son los sitios en los cuales ocurre el acoplamiento de aminoácidos para formar proteínas; así, mientras más proteína este fabricando más ribosomas tendrá la célula (Curtis y Barnes, 2004).

La región ITS es, en el genoma de los eucariotes, la que se encuentran entre los genes 18S y 28S que codifican para los ARN ribosomales (e incluye el gen 5.8S) y al ser una región altamente conservada se la utiliza ampliamente en estudios de clasificación y filogenia de organismos eucariotes, incluyendo los hongos (Martin y Rygielwicz, 2005).

2.4.2.1. Región Espaciadora Transcriptora Interna (ITS) del ADN Ribosomal (rDNA)

El ADN_r es la región del genoma fúngico más utilizada para estudios filogenéticos (Hillis y Dixon, 1991; Bruns y et al., 1992). Esta región ha sido seleccionada principalmente por el hecho de que los genes del ADN_r son multicopia y están organizados

En el ADNr se encuentran las regiones ITS1 hasta ITS5 que flanquean el gen 5.8S muestran una gran variabilidad entre los eucariotas. La longitud de las secuencias de cada una de estas dos regiones varía desde más de 1000 pb en las células humanas hasta menos de 300 pb en algunas levaduras (González y col., 1990; Joseph y col., 1999). Estas regiones han sido utilizadas en numerosos estudios para la identificación de especies fúngicas (Iwen y col., 2002).

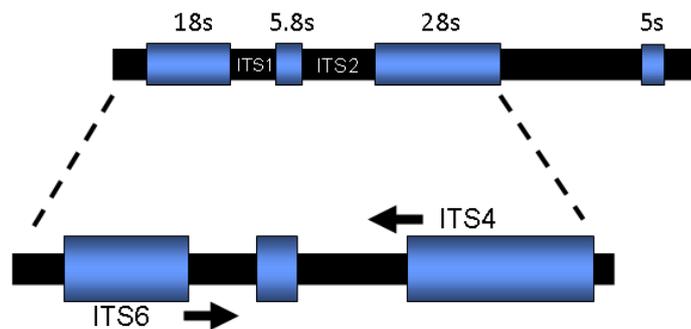


Figura 1. Estructura de la Región Espaciadora Transcritora Interna (ITS).¹

Estudios filogenéticos han sido posibles a partir del diseño y descripción de iniciadores específicos por parte de White *et al.*, (1990), para amplificar y secuenciar varios segmentos del rDNA mitocondrial y nucleico de hongos (Martyn *et al.*, 2000).

¹ Fuente <http://biomodel.uah.es/model1j/rna-prot/ribosomait5-gif.htm>

2.4.2.2. Secuenciación Automática de ADN

La mayoría de los métodos de secuenciación automática utilizados actualmente son modificaciones del método desarrollado por Sanger y colaboradores a finales de los años 70. En este método, el DNA que va ser secuenciado funciona como un molde para la síntesis enzimática de un nuevo DNA que comienza en un sitio definido por la unión de un primer. En la reacción se utiliza una mezcla de desoxinucleótidos y didesoxinucleótidos a unas concentraciones que crean una probabilidad finita de que un didesoxinucleótido se incorpore en lugar del correspondiente desoxinucleótido en cada posición de la cadena que está siendo sintetizada (Dovichi, 1990).

La secuenciación automática se caracteriza por realizar rondas sucesivas de desnaturalización, hibridación y extensión en un termociclador, dando como resultado una amplificación lineal de la extensión. Estos productos bien se cargan en un gel o se inyectan en un capilar para la obtención de su secuencia de bases (Sambrook, 1989 citado por Rodríguez, 2006).

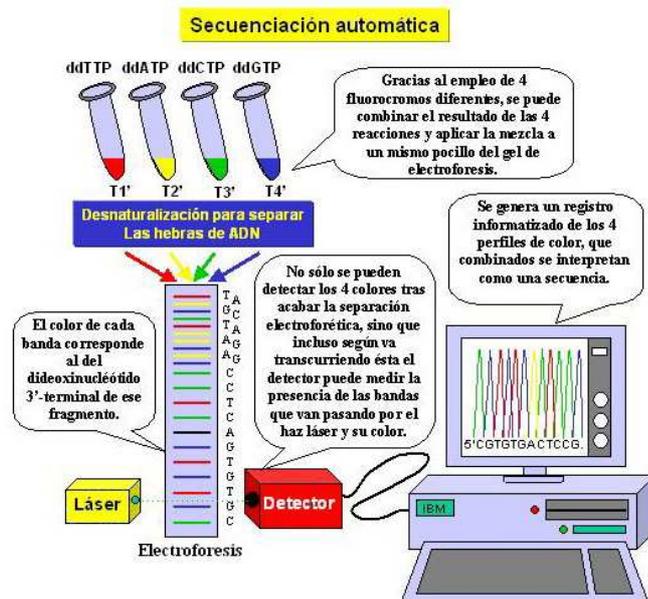


Figura 2. Representación de Secuenciación automática.²

El método de secuenciación permite conocer en forma detallada la secuencia del ADN; cuando se pretende determinar especies de microorganismos se debe usar la información de la secuenciación para analizarla con el banco de genes NCBI (National Center for Biotechnology Information) mundial mediante el uso de programas bioinformáticos como el BLAST y CLUSTALW.

2.4.2.3. Filogenia Molecular

Según Vandamme (2003), la filogenia molecular, es el estudio de la evolución de los organismos a través del análisis de sus secuencias de ADN o de aminoácidos. La filogenia nos proporciona el fundamento para la clasificación de los organismos.

² Fuente www.biotechniques.com-multimedia-archive.gif.htm

Morfológicamente no es posible comparar una bacteria con un hombre, sin embargo si es posible establecer una comparación con moléculas de ADN de ambos organismos, que están formadas por el mismo lenguaje de bases.

Pace, 1997 menciona que las relaciones filogenéticas entre organismos basadas en las secuencias de ADN o de proteínas, suele ilustrarse mediante un árbol filogenético, el cual nos muestra las partes de los organismos que están más íntimamente relacionados. Los árboles filogenéticos constan de:

Raíz.- Es el punto de inicio o ancestro común de individuos genética y evolutivamente relacionados.

Nodo.- Es un lugar en el que se concentra la información genética pudiendo subdividirse hacia otros nodos (Nodo intermedio) o no (Nodo terminal).

Rama.- Son las derivaciones de información genética de un nodo hacia otro nodo.

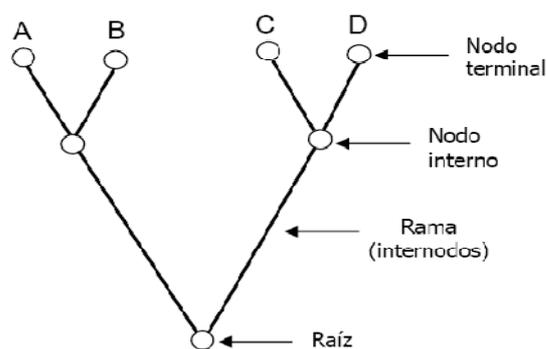


Figura 3. Representación esquemática de un árbol filogenético. A, B, C y D representan a organismos en estudio (adaptación de Berbee y Taylor, 1999).

Estos árboles representan las relaciones filogenéticas entre los diferentes taxones. Cada nodo es el punto donde cada rama se bifurca o se termina. Los nodos terminales representan las secuencias conocidas de los organismos (Haro, 2005).

2.4.2.3.1. Programas Informáticos BLAST y CLUSTAW

El BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa o banco de genes mundial que almacena la información genética de todas las especies: humana, animal y vegetal, incluyendo los hongos. Por medio de este programa se puede comparar la información genética obtenida de la secuenciación con la información genética almacenada en el BLAST y determinar género o especie del organismo en estudio (Iwen, 2002).

El CLUSTALW, es un programa que permite alinear las secuencias obtenidas comparadas con la ayuda de la base del BLAST, es decir accede a obtener el lugar exacto de la secuencia de ADN.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. Ubicación Política

Cuadro 2. Situación política del área de investigación.

Provincia	Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón	Santo Domingo
Parroquia	Luz de América
Sitio	Laboratorio de Fitopatología del Área Académica IASA II Hacienda “San Antonio” perteneciente a la ESPE localizada en el km 35 Vía Santo Domingo – Quevedo.



Figura 4. Mapa del Ecuador



Figura 5. Mapa de Santo Domingo

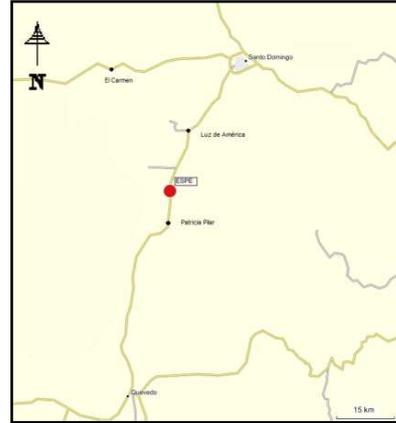


Figura 6. Croquis del sitio

3.1.2. Ubicación Geográfica

Cuadro 3. Situación geográfica del área de la investigación

Longitud	UTM Este (x): 666920 / 694760
Latitud	UTM Norte (y): 9926280 / 9944700
Altitud	234 msnm

Fuente: Instituto Geográfico Militar, 2000

3.1.3. Ubicación Ecológica

La zona en mención corresponde de acuerdo a la Clasificación Ecológica de Holdridge a Bosque húmedo tropical (b.h - T).

Cuadro 4. Características agroclimáticas de la zona de Laboratorio.

Temperatura media	23,1 °C
Precipitación anual	3.306 mm
Humedad Relativa	91,5%

Fuente: INAMHI. (2008). Estación Meteorológica: Puerto Ila

3.2. MATERIALES

3.2.1. Materiales de la Fase de Laboratorio

3.2.1.1. Equipos

- Autoclave automática vertical, Market Force B020p4010
- Cámara de flujo laminar, Pc4pascal CSB120
- Estufa incubadora, Memmert 04773-0888
- Refrigerador, Coolmaster Challenger
- Congeladora a -80°C, Thermocientific Merck Revco
- Microscópio Optico, Olympus pluss
- Sistema de Electroforesis Vertical, Cleaver ESCO swd maxi 24640.
- Termociclador, Termo EC4000p serie90 programable
- Termobloque, Thermomixer Compact Eppendorf AG5350
- Vortex, VWR Lab dancer 03.277510
- Centrífuga Eppendorf mini spin plusbAg 22331 Hamburg
- Centrífuga refrigerada, Sigma 3-18K serie 118155
- Transiluminador, con cámara, Wealtec Dolphin View 25885 CCDamera 200n/
Sonyvideo grafic pintor up897MD.
- Sorvona, WP biodocit System 154412
- Microondas. LG Sensor Microwavw
- Destilador de Agua, Milipore Automatic model Pro600002
- Fluorometro, Qubit. TM fluorometer invitrogen
- Agitador Orbital, VWR H809389

- Hot plate, Cimasec2 Themoyne Sp 46925
- Balanza electrónica, Pioner Ohaus N13123 8-20vdc-4w

3.2.1.2. Sustancias y reactivos

- Agua destilada estéril
- Alcohol antiséptico
- Hipoclorito de Sodio al 5%
- Medio de cultivo Agar Papa Dextrosa PDA
- Sulfato de Estreptomicina
- Nitrato de Calcio
- Nitrato de potasio
- Fosfato de potasio
- Cloruro de calcio
- Ácido cítrico
- Sacarosa
- Alcohol etílico
- Buffer CTAB
- Proteínasa K
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamil
- RNAasa
- Fenol-alcohol isoamilico
- Acetato de sodio

- Etanol 75%
- Agarosa
- Agar
- Bromuro de etidio
- TE(Tris – EDTA)
- Agarosa
- TBE(Tris base, Boro, EDTA)
- Isopropanol
- Primers Universales ITS 1 – ITS 4
- dNTPS
- Cloruro de Magnesio
- Taq Polimerasa
- Buffer 5x
- Agua ultra Pura
- Marcador de peso molecular de 100bp

3.2.1.3. Materiales de acero, vidrio y otros

- Agujas de punta recta
- Asas de inoculación
- Cuchara espátula
- Sacabocados № 3
- Homogenizador mecánico

- Pinza
- Bisturí
- Mechero
- Placas porta y cubre objetos
- Vasos de precipitación de 250 ml, 1000 ml
- Matraz erlenmeyer
- Varilla de vidrio
- Cajas petri de vidrio (70 mm – 90 mm)
- Cajas petri desechables
- Tubos eppendorf
- Juego de micropipeta BOECO μL .
- Algodón estéril
- Papel filtro
- Puntas con filtro
- Papel parafilm
- Guantes de cirugía
- Mascarilla
- Material vegetal enfermo
- Material fungoso

3.2.1.4. Materiales de Oficina y toma de información

- Equipo de computación. (PC, pantalla, etc)
- Suministros de oficina.(Papel bond, carpetas, lápices, etc.)
- Libreta de campo.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Diseño Experimental

3.3.1.1. Factores a probar

C1...C11; L1... L3: Cepas de *Trichoderma*

M1: Aislado de *Paracercospora fijiensis* Z.

A: Testigo absoluto (con *Mycosphaerella fijiensis*)

En donde

C: Cepas nativas colectadas

L: Cepas de *Trichoderma* de la colección IASA II

3.3.1.2. Tratamientos a comparar

En el presente trabajo se evaluó quince tratamientos, que corresponden cada tratamiento a la localidad donde fue recolectada la muestra y de cepas pertenecientes a la colección IASA II, tal como se presenta en el cuadro 5.

Cuadro 5. Esquema de los tratamientos del ensayo de Acción Inhibitoria “*in vitro*”.

TRATAMIENTO	CEPA CONTROL BIOLÓGICO <i>Trichoderma</i>		PATÓGENO <i>Paracercospora</i>
T1	C1- Quinde	vs.	M1
T2	C2 – Yamile	vs.	M1
T3	C3- La Union	vs.	M1
T4	C4- Paisaje	vs.	M1
T5	C5- Congoma	vs.	M1
T6	C6- San Ignacio	vs.	M1
T7	C7- Vilmita	vs.	M1
T8	C8- La Maná	vs.	M1
T9	C9- Machala	vs.	M1
T10	C10- San Gabriel	vs.	M1
T11	C11- Bonanza	vs.	M1
T12	L1- C9	vs.	M1
T13	L2- MT (Mulaute)	vs.	M1
T14	L3- SG (San Gabriel)	vs.	M1
T15	TESTIGO		M1

M1: Patógeno (*Paracercospora fijiensis*)

3.3.1.3. Repeticiones o bloques

El ensayo se realizó con cinco repeticiones por cada tratamiento

3.3.1.4. Características de la unidad experimental

En laboratorio la unidad experimental estuvo representada por una caja Petri, en la que se realizó la siembra y medición del crecimiento de patógeno y antagonista. El medio de cultivo utilizado fue agar papa dextrosa (PDA).

3.3.1.5. Análisis Estadístico

El análisis estadístico utilizado para evaluar el antagonismo de las cepas de *Trichoderma* mostrado ante *Paracercospora fijiensis* fue un análisis de regresión y correlación para determinar la eficiencia de las cepas de *Trichoderma spp.* en la inhibición de *Paracercospora fijiensis*, entre el tiempo de evaluación y el crecimiento radial en mm en el ensayo de inhibición (Cuadro 8).

Cuadro 6. Modelo de la ecuación lineal

Ecuación de la regresión	$y = a + bx$
--------------------------	--------------

Variable a Medir

La variable que se tomó en consideración fue el crecimiento radial en mm del antagonista *Trichoderma spp.* y del patógeno *Paracercospora fijiensis*

3.3.2. Métodos Específicos de Manejo del Experimento

3.3.2.1. Localidades Muestreadas

- Quinindé.- Vía Santo Domingo - Esmeraldas
- La Unión.- Vía Santo Domingo - Esmeraldas
- Cóngoma.- Vía Santo Domingo - Congoma
- San Ignacio.- Vía Santo Domingo – Quevedo
- Bonanza.- Vía Santo Domingo – Quevedo
- San Gabriel.- Vía Santo Domingo - Quevedo
- Vilmita.- Buena Fé - Quevedo
- Yamilet.- Los Ángeles - Quevedo
- Paisaje.- Buena Fé - Quevedo
- Mercedes. Vía Quevedo – La Maná
- Machala.- Machala

3.3.2.2. Obtención del Agente Patógeno *Paracercospora fijiensis*

De material vegetal enfermo del cultivo de banano (de las hojas dos y tres) se obtuvo aislados de *Paracercospora fijiensis*, usando la metodología y técnicas de aislamiento en laboratorio propuestas por Lalancett *et al.*, 1984 citado por Aguirre *et al.*, 2003 que consistió en usar jeringas de plástico desechables de 10 cm³, las cuales se llenaron con un medio PDA - azul de metileno - estreptomycinina luego de su esterilización y previa su solidificación.

Una vez que el medio se solidificó y para capturar en el campo los conidios de *Paracercospora fijiensis* se cortó el extremo anterior de las jeringas para utilizarlas como cilindros dispensadores de medio presionando el émbolo de la jeringa hasta que quede a libre exposición aproximadamente 2 mm en espesor de medio y se cortó cuidadosamente con un bisturí obteniendo discos de una superficie lisa. Este disco se presionó suavemente sobre el área de desarrollo activo de la infección en las hojas.

Se colocaron dos discos por lámina portaobjetos, las cuales se depositaron dentro de una cámara húmeda para inducir la difusión rápida del colorante a través de las células de los conidios del muestreo y evitar la deshidratación del medio (Anexo 1).

Las láminas portaobjetos con los discos obtenidos se montaron tan pronto como fue posible en el microscopio compuesto para observar las características morfológicas de los conidios estudiados a través del objetivo 40X.

En los casos en que no se logró la identificación con los discos obtenidos en campo se utilizaron los mismos para una siembra directa en cajas Petri con medio de cultivo PDA el cual se incubó en la estufa a 28 °C durante 14 días, tiempo suficiente para que los hongos sembrados expresen su desarrollo.

3.3.2.3. Identificación del Agente Patógeno *Paracercopsora fijiensis*

Con el fin de identificar el patógeno se procedió a describir sus características morfológicas y compararlas con claves especializadas de identificación de hongos patógenos de Joseph Gilman (1963).

3.3.2.4. Obtención del Antagonista *Trichoderma spp.*

Los aislados del biocontrolador se obtuvieron a partir de muestras de suelo procedentes de las localidades en estudio, cada una de ellas constituida por 4 submuestras (200 gr c/u). (Anexo 2).

Se tamizaron y pesaron 10 gr de suelo y se los disolvió en 100 ml de agua destilada estéril. La solución madre se dispensó en medio de cultivo específico para *Trichoderma*. Además se utilizó el sistema de siembra en grumos depositando homogéneamente sobre la superficie de la caja Petri (Anexo 1). Las cajas se incubaron en una estufa a 28 °C durante 14 días, realizando luego repiques para purificar el hongo.

Producto del aislamiento se obtuvieron 11 cepas nativas de *Trichoderma spp.*, las cajas con estas cepas fueron conservadas en refrigeración para realizar posteriormente el ensayo de determinación del antagonismo.

3.3.2.5. Identificación del Antagonista *Trichoderma spp.*

Se realizó la identificación morfológica del antagonista *Trichoderma spp.* utilizando preparados microscópicos en placas portaobjetos comparando las características con claves taxonómicas especializadas de Joseph Gilman (1963).

La identificación molecular de *Trichoderma spp.* se realizó mediante técnicas específicas que consistieron en:

3.3.2.5.1. Extracción de ADN de cepas de *Trichoderma spp.*

Para la extracción de ADN se siguió la metodología propuesta por Kim *et al.*, 1992 modificada por Lee, 2000; Argoti, 2007; Cobos, 2009 (Anexo 3).

Con las muestras obtenidas mediante el protocolo de extracción se realizó la corrida en el sistema de electroforesis horizontal, para corroborar la presencia de ADN en las muestras (Anexo 4).

3.3.2.5.2. Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el producto de ADN de las muestras se colocó en un termociclador, usando de igual manera un protocolo exclusivo para realizar PCR (Anexo 5), del cual se obtuvo una cadena de ADN amplificada.

3.3.2.5.3. Análisis de Secuencias

Para la secuenciación se envió el producto de las muestras de ADN amplificadas al laboratorio especializado MACROGENE en Seúl-Corea.

Las muestras se enviaron con 20 ul de primers y 15 ul de cada uno (reverse and forward) por cada 5 muestras enviadas, a una concentración de 15 picomole/ul.

Para el envío de la muestras se llenó un formato digital (Anexo 8) con el nombre de la muestra y el de los primers tanto reverse como el forward.

Para ejecutar la identificación molecular de las cepas seleccionadas de *Trichoderma* se utilizó los programas informáticos de Bioedit para realizar la secuencia consensus que posteriormente fueron subidas al programa MEGA 4 para hacer la correspondiente alineación y el árbol filogenético donde se obtuvo mediante el BLAST los siguientes resultados, que se presenta en el cuadro 7 y demuestran la comparación entre el código genético de especies de *Trichoderma* almacenados en el BLAST y el código genético de las cepas nativas de *Trichoderma*.

3.3.2.6. Determinación del antagonismo de *Trichoderma* en contra de *Paracercospora fijiensis*

Se procedió a extraer discos de los cultivos puros del patógeno de 14 días de crecido con el saca bocados N° 3, y se realizó la siembra diametralmente en una caja

Petri con medio de cultivo, al mismo tiempo se colocó en la misma caja Petri discos con el agente de control biológico. Una vez realizada la siembra se incubó a 28 °C (Anexo1).

Se realizó lecturas del crecimiento radial tanto del antagonista *Trichoderma spp.* como del patógeno *Paracercospora fijiensis* durante ocho días, obteniendo los promedios del crecimiento final en mm/día, para de esta manera determinar mediante las mediciones diarias la acción inhibitoria que ejercía *Trichoderma* contra *Paracercospora*. Posteriormente con los datos obtenidos de las mediciones y con la ayuda del Programa estadístico Infostat se realizó pruebas estadísticas de regresión y correlación.

IV. RESULTADOS

4.1. IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO

De las muestras de material enfermo del cultivo de banano procedente de las zonas en estudio se aisló e identificó el género de hongo causante de la Sigatoka negra en el cultivo de banano.

La descripción de las características morfológicas del hongo en medio de cultivo corresponde a *Paracercospora fijiensis* que presentó un crecimiento circular, con micelio algodonoso y pegado al medio de cultivo, de coloración blanco durante las primeras 48 horas, posteriormente conforme se desarrolla toma un color amarillo anaranjado brillante (Figura 7), presenta conidios en forma de mazo o ser a la vez mazo cilíndrico conteniendo 1 -6 septas; son cónicos desde la base hasta la marca basal. Estas características concuerdan con las claves de identificación propuestas por Joseph Gilman (1963).



Figura 7. Desarrollo de *Paracercopora fijiensis* en medio de cultivo PDA.

4.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL CONTROLADOR *Trichoderma spp.*

De las localidades muestreadas se aislaron e identificaron morfológicamente 11 cepas de *Trichoderma spp.*

Las características morfológicas del hongo género *Trichoderma* aislado se describen así: Hifas trepadoras, septadas, originando un césped miceliar aplanado, sólido. Conidióforos erectos, saliendo de ramas laterales cortas ramificadas, ramificación comúnmente opuestas, sin el ápice hinchado y produciendo de manera terminal cabezuelas de conidios. Conidios pequeños, la mayoría globosos, hialinos o de colores brillantes que son similares a las descritas en la claves taxonómicas de Gilman, 1963.



Figura 8. *Trichoderma*. a) conidióforos; b) conidios

4.2.1. Identificación Molecular de las Cepas Nativas de *Trichoderma spp.*

Seleccionadas

Para la identificación molecular se modificó y estandarizó un protocolo (Argotti, E; 2009) de extracción de ADN (Anexo 3).

4.2.1.1. Extracción y amplificación de ADN de cepas de *Trichoderma spp.*

De la metodología de extracción (Anexo 3) se obtuvo un producto de 100 µl de la resuspensión en TE conteniendo el pellet de ADN. Se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Anexo 7) para cuantificar el ADN obtenido mediante fluorometría, dando como resultado cantidades en un rango de 78 a 90 ng/uL (en muestras sin diluir). Esta resuspensión pasó al proceso de amplificación (PCR) en donde se obtuvo cadenas amplificadas con primers universales de las regiones ITS 1 e ITS 4.

Muestras de Bandas de ADN Amplificadas en el Termociclador

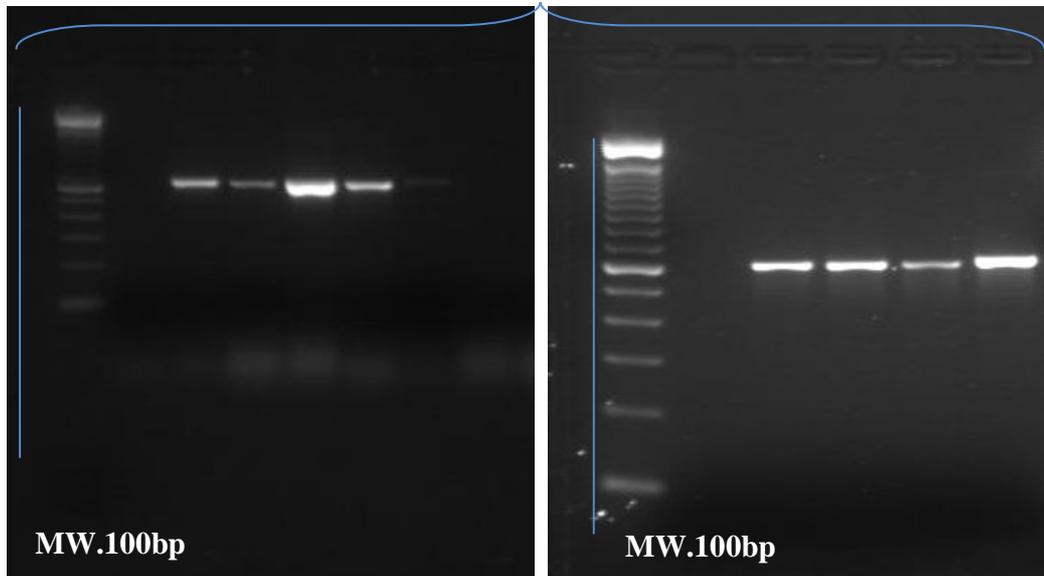


Figura 9. Bandas de ADN amplificadas

En la Figura 9 se puede observar bandas intensas y bien marcadas con un peso molecular de 600 bp que es lo que corresponde al peso de las muestras.

4.2.1.2. Resultados de la Secuenciación

Este proceso realizado por el laboratorio MACROGENE (Seul – Corea) dio como resultado las secuencias de ADN para cada cepa.

Con la ayuda de software MEGA 4 – BLAST se obtuvo la identificación de las secuencias recibidas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de cepas colectadas de *Trichoderma* con especies de *Trichoderma* almacenadas en el BLAST.

Tratamientos	Cepa	Accesion	Descripción	Max Score	Total Score	Query Coverage	E -value	Max Ident
T1	Quinindé	EU280068.1	<i>Trichoderma spirale</i>	1112	1112	99%		99%
T2	Yamile	FJ605246.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	1098	1098	99%		99%
T3	La Unión	EF442079.1	<i>Hypocrea lixii</i> anamorfo <i>Trichoderma harzianum</i>	1116	1116	99%		99%
T4	Paisaje	GQ221864.1	<i>Trichoderma viride</i>	970	970	96%		98%
T5	Cóngoma	FJ605246.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	1083	1083	100%		98%
T6	San Ignacio	FJ605246.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	1107	1107	99%		99%
T7	Vilmita	FJ605246.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	998	998	100%		99%
T8	La Maná	DQ000632.1	<i>Hypocrea pezizoides</i>	95.3	95.3	14%	3 e - 16	87%
T9	Machala	EU280110.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	1050	1050	95%		98%
T10	San Gabriel*	-	-	-	-	-	-	-
T11	Bonanza	FJ605246.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	1098	1098	99%		99%
T12	C9	FJ605246.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	1057	1057	99%		98%
T13	MT	GQ203535.1	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	599	885	77%	9 e -168	96%
T14	SG	EU280110.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	609	735	95%	8 e -171	95%

* El resultado de la secuencia de la cepa de San Gabriel no pudo ser identificada por el programa debido probablemente a que no hubo referencias en la base de datos.

En el cuadro 7 se resaltan las tres cepas nativas seleccionadas en fase de laboratorio de la investigación corresponden al género *Trichoderma*. Estas cepas fueron seleccionadas debido a que inhibieron la acción del patógeno significativamente (Cuadro 8).

Las mencionadas cepas corresponden a las localidades de Bonanza y Machala, que pertenecen a la especie de *Trichoderma asperellum*; y la cepa de la localidad de Paisaje pertenece a la especie de *Trichoderma viride*.

Con la finalidad de observar las diferencias existentes entre las cepas nativas de *Trichoderma spp.* se construyó un árbol filogenético con la ayuda del programa MEGA 4 (Figura 10).

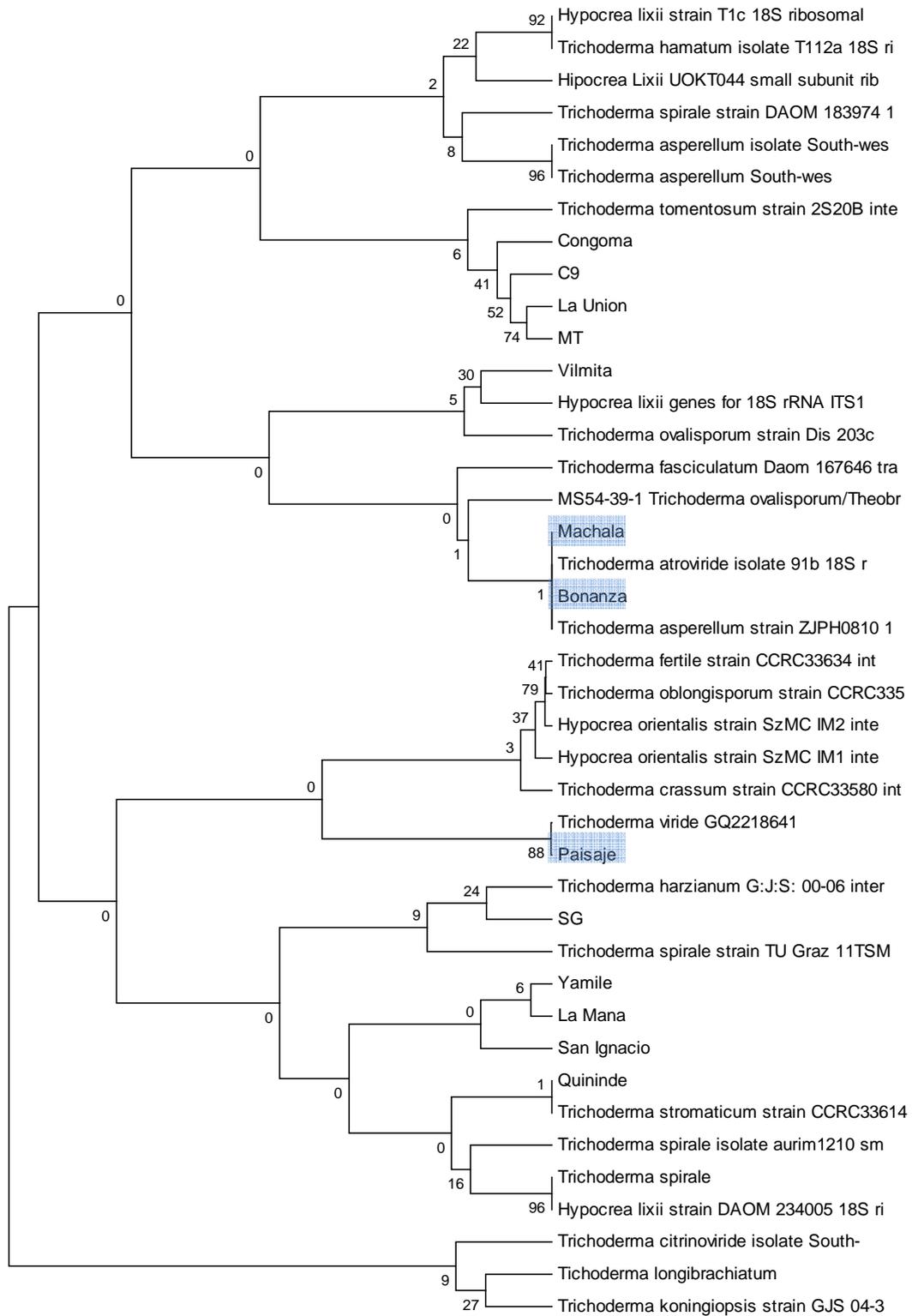


Figura 10. Árbol filogenético de las cepas obtenidas de las localidades en estudio.

La figura de árbol filogenético nos demuestra las relaciones evolutivas de los taxones, esto se dedujo utilizando el método de máxima parsimonia.

4.3. ENSAYO DE ACCIÓN INHIBITORIA

Con el fin de determinar la eficiencia de las cepas de *Trichoderma spp* en contra el patógeno *P. fijiensis* causante de la enfermedad Sigatoka Negra, se tomó en consideración la información obtenida de los registros de las mediciones de la acción inhibitoria *in vitro*, posteriormente utilizando estos datos se utilizó el programa estadístico Infostat para determinar y seleccionar las tres mejores cepas del hongo antagonista que provocaron un menor crecimiento de acuerdo a los mayores y menores incrementos del hongo antagonista (*Trichoderma spp.*) vs patógeno (*Paracercospora fijiensis*), dando como resultado que los tratamientos T4 (Cepa de *Trichoderma viride*), T9 y T11 (cepas de *Trichoderma asperellum*) correspondientes a las cepas recolectadas en las localidades de Paisaje, Machala y Bonanza presentaron diferencias estadísticas significativas y demostrando de igual manera una mayor capacidad antagónica frente al patógeno.

Se estableció la regresión y correlación entre el tiempo de evaluación y el crecimiento radial de *P. fijiensis* en cada una de las cepas de *Trichoderma spp.*

Las cepas de Paisaje, Machala y Bonanza demostraron su eficacia de control frente al patógeno entre 84% y 90% de inhibición.

Cuadro 8. Regresión y Correlación entre el tiempo de evaluación en días y el crecimiento radial en mm de cada cepa de *Trichoderma spp.*, en la prueba de antagonismo de laboratorio en contra de *Paracercospora fijiensis*.

CONTROL BIOLÓGICO		PATOGENO	
TRATAMIENTO	TRICHODERMA	TRATAMIENTO	PARACERCOSPORA
T1	Y= 12,24 + -0,11x r = -0,04**	T1	Y= 0,73+ -0,13x r = - 0,65**
T2	Y= 3,07+ -0,04x r = -0,31**	T2	Y= 0,67+ -0,11x r = -0,83**
T3	Y= 3,66+ -0,15x r = -0,84**	T3	Y= 0,46+ -0,08x r = -0,75**
T4	Y= 2,99+ 0,35x r = 0,83**	T4	Y= 0,52 + -0,16 x r = -0,84**
T5	Y=2,07+ 0,16x r = 0,52**	T5	Y= 0,95+ -0,09x r = -0,81**
T6	Y= 1,93+ 0,18x r = 0,50**	T6	Y= 0,75+ -0,13x r = -0,84**
T7	Y= 1,60+ 0,02x r = 0,08**	T7	Y= 0,72+ -0,12x r = -0,84**
T8	Y= 2,55+ 0,04x r = 0,32**	T8	Y= 0,60+ -0,10x r = -0,82**
T9	Y= 2,03+ 0,19x r = 0,89**	T9	Y= 0,98+ -0,17x r = -0,84**
T10	Y= 1,94+ 0,05x r = 0,32**	T10	Y= 0,85+ -0,14x r = -0,89**
T11	Y= 1,76+ 0,22x r = 0,82**	T11	Y= 0,99+ -0,17x r = -0,90**
T12	Y= 3,84+ -0,25x r = -0,58**	T12	Y= 0,64+ -0,11x r = -0,83**
T13	Y= 3,18+ -0,15x r = -0,36**	T13	Y=0,67+ -0,11x r = -0,88**
T14	Y= 3,25+ -0,33x r = -0,89**	T14	Y= 0,79+ -0,13x r = -0,78**
		T15	Y= 1,04+ -0,14 r = -0,82**

 Mayores incrementos

 Menores incrementos



Figura 11. Cepas de *Trichoderma spp.* pertenecientes a las localidades de Paisaje, Machala y Bonanza

De manera general, todas las cepas de *Trichoderma* inhibieron en mayor o menor grado el crecimiento de los patógenos, debido a sus diferentes mecanismos de antagonismo no obstante los aislamientos de *Trichoderma* PJ (T4) y Mch (T9) que corresponden a las zonas Paisaje y Machala respectivamente, se desarrollaron sobre el patógeno, desmostrando actividad antagónica por competencia y Bnza (T11) correspondiente a la zona de Bonanza que realizó su actividad antagónica por antibiosis, siendo las de mayor poder antagónico para el control del patógeno.

V. DISCUSIÓN

La meta principal de la presente investigación fue evaluar el potencial antagonico de las cepas nativas de *Trichoderma spp.* para el control del hongo *Mycosphaerella fijiensis* en su estado anamorfo *Paracercospora fijiensis* en el cultivo de banano en fase de laboratorio. Para alcanzar el objetivo fundamental de dicha meta se trazó objetivos específicos que sirvieron de procedimientos a seguir para obtener los resultados esperados.

La obtención, aislamiento e identificación morfológica de cepas nativas de *Trichoderma spp.* fueron las opciones elegidas y requeridas como técnicas microbiológicas a seguir para la caracterización morfológica de las muestras, sin embargo las técnicas moleculares, en especial la PCR, superan esta barrera al ser consideradas técnicas sensibles y rápidas.

Las cepas nativas de *Trichoderma spp.* tuvieron crecimiento variable, algunas crecieron rápido y otras lento, esto es debido a que la fase de adaptación al medio depende del origen de cada cepa ya que fueron aisladas de diferentes zonas bananeras del Ecuador, otra condición pueden ser que las necesidades nutricionales no fueron las adecuadas o suficientes para el desarrollo de estas cepas de *Trichoderma spp.* Benítez *et al.* (2008), coincide en mencionar que el crecimiento y proceso de biocontrol depende de la cepa de *Trichoderma*, tipo de cultivo y de condiciones ambientales tales como: disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura o la concentración de hierro.

Los resultados obtenidos del ensayo de inhibición *in vitro*, están dados porque *Trichoderma* tiene varias formas de crecimiento micelial y esporulativo, también debido a que posee propiedades antibióticas y enzimáticas que determinan su capacidad biótica y antagónica, además son fácilmente cultivables en medio de cultivo PDA y la gran mayoría tienen rápido crecimiento debido a que son competidoras por fuentes nutritivas. Esto corrobora lo informado por Zunino (2004), quién indica que existe diferencias significativas en la tasa de crecimiento individual de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas y comerciales.

El análisis de secuenciación de la cadena de ADN de los tres agentes de control biológico confirmó el género de los microorganismos ubicándolos en el orden Hyphales, género *Trichoderma* con un porcentaje de similitud del 99 % con la especie *asperellum* a las cepas de las localidades Bonanza y Machala y con la especie *viride* a la cepa de la localidad de Paisaje, siendo estas las de mayor importancia en nuestra investigación ya que evidenciaron mayor capacidad antagónica contra el patógeno.

Gracias a las técnicas moleculares y de secuenciación se identificó de una manera rápida y efectiva las cepas de biocontrolador que obtuvimos del ensayo *in vitro* de inhibición. Sin embargo al conocer que *Trichoderma* es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y que una de sus características es no poseer, o no presentar un estado sexual determinado permiten que este microorganismo tenga más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas; se tomó en

consideración conocer las especies de *Trichoderma* a las que pertenecían las cepas *Trichoderma* recolectadas de las zonas de estudio y de las cepas de colección del IASA II.

Del estudio molecular realizado a todas las cepas del ensayo *in vitro*, a las cuales se realizó filogenia molecular se encontró que existe cepas de *Hypocrea lixii* *Hypocrea orientalis* que son los anamorfos (estadios asexuales) de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* respectivamente, además de *Trichoderma spirale* y *Trichoderma longibranchiatum* que son las especies más conocidas y por lo tanto más estudiadas de acuerdo a la investigaciones realizadas por Stefanova, M.(1999).

VI. CONCLUSIONES

Las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas en condiciones *in vitro*, demostraron una gran actividad antagónica en contra del patógeno *Paracercospora fijiensis*

Las cepas Paisaje, Machala y Bonanza alcanzaron los menores incrementos radiales diarios de *Paracercospora fijiensis*, considerándose de esta manera los más antagónicos para controlar la enfermedad

De acuerdo al análisis estadístico realizado nos indica que las cepas pertenecientes a los tratamientos de las cepas T4, cepa T9 y de la cepa T11 presentaron diferencias significativas entre el 84% y 90 % con respecto a los demás tratamientos, lo que demuestra que estas cepas ejercen un mejor control antagónico contra el patógeno.

El árbol filogenético nos demuestra que las cepas Machala y Bonanza pertenecen al grupo de *Trichoderma asperellum* y que la cepa Paisaje pertenece al grupo de *Trichoderma viride*.

VII. RECOMENDACIONES

Realizar ensayos de acción inhibitoria con las cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Paisaje, Machala y Bonanza) y nuevas cepas aisladas de zonas productoras de banano, a fin de ampliar el banco de cepas antagonistas en contra de los patógenos causante de la Sigatoka Negra).

Utilizar primers específicos para *Trichoderma* spp. en la extracción de ADN, para lograr una secuenciación con alto porcentaje de similitud y poder determinar con exactitud las especies del biocontrolador.

Se recomienda llevar a campo el ensayo de acción inhibitoria in vitro de *Trichoderma* contra el patógeno *Paracercospora fijiensis* causante de la enfermedad de la Sigatoka Negra en el banano.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

AEBE,2006. Banano (en línea) Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador; Informe económico. Disponibe en www.aebe.info.com. Consultado el 27 de febrero de 2010.

ACEVEDO,1995. Frecuencia de las sigatokas negra y amarilla en plátano (*Musa spp.*) de acuerdo a los estados de desarrollo de la planta. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 32(125): 465-470, 2008. ISSN 0370-3908.

ACOSTA,2003 Effets de fondation et différenciation génétique aux échelles continentale et locale chez *Mycosphaerella fijiensis*, champignon responsable de la maladie des raies noires du bananier. Thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier, France. 96 p.

AGUIRRE,2003 Evaluación de la efectividad del antagonista *Trichoderma lignorum* al tratar la semilla de arroz (*Oriza sativa*), contra el hongo *Rhizoctonia solani*". Departamento Técnico Agro servicios ; Uldarico Varón Reyes e Iván Ramírez Segura. Colombia
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/viewFile/11759/12297>

AGRIOS, G. 2000. Manual de Fitopatología. 2da Edición. Editorial Limusa. México DF, México. 838 pág.

BARRERA, H., RODRIGUEZ, I. 2004, La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, Ciencia Uanl; Vol. VII, No.3

BENÍTEZ T., RINCÓN A.; LIMON M. 2004. Mecanismos de Biocontrol de cepas de Trichoderma (en línea). International Microbiology. Consultado el 29 de Nov. Del 2008. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/scielo.php>

BERBEE,1999; Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR, Nucleic Acids Research: Vol.18, No.22 6739

BRUNS,1992; Control of contamination associated with PCR and other amplification reactions, Molecular BioProducts, [Disponible en línea], <http://gene-quantification.com/mifflin-optimisation-report.pdf>.

CERVANTES, M. (2004). Evaluación in vitro de tres aislamientos de Trichoderma spp. como antagonista de patógenos de post-cosecha de los frutos cítricos. Centro Agrícola. 42-45 p.

CORPEI. 2007. Banano (en línea). Perfiles de Productos. Centro de Inteligencia Comercial. CICO. Consultado el 25 Marzo. 2008. Disponible en: http://200.110.94.59/productos_down/perfil_de_banano_2005765.pdf

CURTIS, H.; BARNES, S. 2004. Biología. Sexta edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires Argentina. Pág. 138.

CHICA, D. 2004 Cultivo del Banano Enfermedades Fungosas Mycosphaerella. Consultado 28 Marzo. 2008. Disponible <http://www.redepapa.org/mycosphaerella4.pdf>

DOVICH, 1990; Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing: laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette» Journal of Chromatography. Vol. 516. pp. 61-67. PMID 2286629

DUBOS, B. 1987. Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. Innovative Approaches to Plant Disease Control. Wiley, N.Y. 107-135 p.

EDEL, 1998; Identificación microbiana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología bacteriana, Universidad de Oviedo. España, Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22(4):238-45

ERAZO, A. 2007. Evaluación de tres dosis de *Trichoderma harzianum*, para el control de tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y costra negra (*Rhizoctonia solani*) en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). Escuela Politécnica del Chimborazo. Riobamba- Ecuador. 16-17 p.

EQUABIOLÓGICA (2006). Agroindustria de Control Biológico del Ecuador (en línea). Consultado 24 Marzo. 2008. Disponible en: http://www.aebe.com.ec/data/files/Inovaciones/productos_biologicos.pdf

EZZIYYANI M., PÉREZ C., SID A., REQUENA M., CANDELA M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Murcia, España. Consultado 27 Marzo. 2008. Disponible en: <http://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/05-TRICHODERMA.pdf>

FAGIANI M 1999. Ficha del Cultivo De Banano. en Línea Consultado el 28 de Marzo de 2008 Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/yuto/info/documentos/tropicales/Microsoft%20Word%20-%20ficha%20banana%20completa.pdf>

FALCONÍ C.,1997. El Control Biológico de Plagas y Enfermedades. Primera Edición. Quito. Ecuador. 200 p.

GILMAN J. 1963. Manual de los Hongos del Suelo. Segunda Edición. Editorial Continental. México. 350 p.

GUZMÁN 2004 Dirección de Investigaciones, Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A.), Apdo. 390-7210, Guápiles

HADDAD 1999. Trichoderma for Biocontrol of plant pathogens: From basic research to commercialized products. Departments of horticultural science and of plant pathology. Cornell University. Consultado el 3 de Noviembre 2008. Disponible en <http://harman.html>

HARO, 2005. En línea. Disponible el 31 Enero del 2010 <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/ContrBiol.htm>

HILLS,D, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), FDA website, [Disponible en línea], <http://www.foodsafety.gov/~frf/rflp.html>

HOWELL, C. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling disease. *Bioc. Sci. and Technol.* 435-41p.

INTA Protección de Cultivos. Costa Rica. Consultado el 24 de Marzo 2008. Disponible en: <http://www.platano.ucr.ac.cr/PEnfermedades.htm>

IWEN,2002 Broad-Range bacterial detection and analysis of unexplained death and critical illness, California, *Emerging Infectious diseases*: Vol.8, No.2

LODISH, H., (2003), *Molecular cell biology*, 5.ed, New York: W.H. Freeman & Co.

MANZO G. 2001. Diversidad de *Mycosphaerella Fijiensis* M. Cultivado con diferente Manejo (en línea) Consultado 26 Marzo. 2008 Disponible en: <http://www.bayerandina.com/bayerand.nsf/soluciones/bananoenfermedades?OpenDocument>

MARIN P, Cultivo del Banano.1992. en Línea . Consultado el 28 de Marzo de 2008 Disponible en: <http://www.fertilizando.com/articulos/Caracteristicas%20y%20Fertilizacion%20Cultivo%20Banano.asp>

MARSEY, 2007; An introduction to ribosome structure. En: The Online Macromolecular Museum Exhibits. http://www.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/gallery.htm (consultado: 18 febrero 2010).

MARTIN, K.J., RYGIEWCZ, P.T. 2005. Fungal specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5: 28-39.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DEL ECUADOR 2005. Banano (en línea). Dirección General de Promoción de Exportaciones e Inversiones Bilaterales – DGPEI. . Consultado el 25 de Marzo. 2008. Disponible en:

- MORA, U. 1999. Pagina de información sobre el cultivo del banano. El guineo (Musa spp) Anexo 9. FAO/CATIE (en línea) Consultado 26 Marzo. 2008
Disponibile en: <http://www.plátano.ucr.ac.cr/Enfermedades/Enfermedades6.htm>
- NUÑEZ L. 2003. Uso de Trichoderma y Control Biológico para el tratamiento de *Fusarium oxisporum* en Babaco. Quito. 90 pp.
- ORIETTA F., LARREA V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Costa Rica. Consultado 26 Marzo. 2008. Disponible en: <http://web.catie.ac.cr/informacion/rmip/rev62/96-100.pdf>
- PACE, N. R.; 1997.- A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. Science, 276: 734-740.
- PAEZ O. 2006. Uso Agrícola del Trichoderma. Consultado 26 Marzo 2008.
Disponibile en: <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.shtml>
- RIVAS M., PLATERO CATIE. Departamento de Agricultura y Agroforestería- INIBAP/LAC. 7170. Turrialba, Costa Rica. grivas@catie.ac.cr
- RODRIGUEZ, 2006; New Tecnicas for PCR. A review. (en línea). www.elsevier.com. Consultado el 25 de Marzo 2009.

SÁNCHEZ J. Introducción al Diseño Experimental. Nueva Reimpresión. 226 pp.

SÁNCHEZ M. 2002. Producción de anticuerpos policlonales contra el hongo causante de la Sigatoka Negra (en línea). Consultado el 24 Marzo. 2008.

Disponible en:

http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/organicos/organicos_ecuador/sigatoka_organico.htm

Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador 2006). en línea. Consultado el 28 de Marzo de 2008 en

<http://www.sica.gov.ec/cadenas/banano/docs/informe2.html>.-

SOTO M 1993. Bananos Cultivo y Comercialización . Segunda Edición

STEFANOVA M., LEIVA A. LARRINAGA L., CORONADO F., 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp para el control de hongos

fitopatógenos del suelo. Departamento de Microbiología. Instituto de Sanidad Vegetal. La Universidad del Zulia. Consultado 28 de Nov. 2009. Disponible en:

http://www.revfacagronluz.org.ve/v16_2/v162z005.html

SURZYCKI, S. 2000, Basic techniques in molecular biology, Berlin: Springer-Verlag

SUQUILANDA M., 2001. Manual de Cultivos Orgánicos. Cuarta Edición

TAPIA A, 1993. Distribución altitudinal de la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerellamusicola*) y la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en Costa Rica. Tesis para optar al grado de Magíster Scientiae. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica. 77p. en línea. Consultado el 28 de Marzo de 2008 en <http://www.acefyn.org.co/PubliAcad/Periodicas/Volumen27/105/12-METODO.pdf>.

TREGUERRES, J., Martínez, V. y Navas, V. 2003, Biotecnología aplicada a la medicina, Madrid: Editorial Díaz de Santos

TRUJILLO,1996 Sigatokas del banano. En: Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. 3ra Edición. Zamorano Academic Press, Honduras. Pp. 217-218.

TROUT,1997 Guide to Molecular Cloning. Methods in enzymology 152. Berger, S. L. Y Kimmel, A. K. 1987

VANDAMME,2003 High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis.» Nucleic Acids Research. Vol. 18. pp. 4417-4421. PMID 2388826 DOI 10.1093/nar/18.15.4417. Consultado el 2009-10-08.

VARGAS, G. 1999. Pagina de información sobre el cultivo del banano. Principales enfermedades del banano (*Musa spp.*) su cultivo e industrialización, San José,

Costa Rica, Editorial Universidad de Costa Rica (en línea) Consultado 27
Marzo 2008. Disponible en:
<http://www.platano.ucr.ac.cr/Enfermedades/Enfermedades6.htm>

VILLEGAS,2000 DNA restriction fragment length polymorphisms in
Mycosphaerella species that cause banana leaf spot diseases. *Phytopathology*,
84(7): 751-755.

WHITE,1990 Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*,
the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycol. Res.* 97:
670-674.

WINDHAM M.; ELAD Y.; BAKER R. 1986. A mechanism for increased plant
growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76:518-521.

YUSUPOV, 2004; Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*
292: 883-896 (2001). DOI: 10.1126/science.1060089

ZERBA 2007, Estudio del ADN ,Secuenciación automática de ADN por la Dra.
Gemma Rodríguez Tarduchy y María Concepción Santiago Martínez Servicio
de Secuenciación automática de ADN .Instituto de Investigaciones Biomédicas
(IIB - CSIC)

ZUNINO G. 2004. Evaluación de tres productos de control biológico comerciales a base de *Trichoderma* spp. y un aislamiento de *Trichoderma* sp. in vitro con énfasis en pruebas de control de calidad. Zamorano. Honduras. Consultado el 15 de Junio 2008. Disponible en: http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis_infolib/2004/T1965.pdf

IX. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad recolectar, aislar, seleccionar, identificar y caracterizar morfológica y molecularmente las cepas nativas de *Trichoderma spp* de varias zonas bananeras del país, con potencial de ser usadas como medida de control alternativo para la Sigatoka Negra del banano. El potencial antagónico de *Trichoderma spp* frente al agente causal *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cuya forma imperfecta se denomina *Paracercospora fijiensis* Morelet, se evaluó mediante un ensayo de acción inhibitoria *in vitro*. Se analizaron 11 cepas de *Trichoderma spp*. recolectadas de diferentes zonas bananeras del país y 3 cepas de *Trichoderma spp*. del banco de cepas del laboratorio de fitopatología (IASA II). El mejor control antagónico de *Trichoderma spp*. contra el patógeno *Paracercospora fijiensis* se obtuvo con los tratamientos T4, T9 y T11 correspondientes a las cepas recolectadas en las localidades de Paisaje, Machala y Bonanza. Estos tratamientos presentaron diferencias estadísticas significativas entre 84% y 90%. Mediante técnicas de caracterización molecular se determinó que las cepas recolectadas en las localidades bananeras de Machala y Bonanza pertenecen al grupo de *Trichoderma asperellum* y la cepa recolectada en la localidad bananera de Paisaje corresponden al grupo de *Trichoderma viride*. Este estudio es una fase preliminar de investigación que servirá para finalmente poder formular un biofungicida que permita controlar los agentes fitopatógenos que disminuyen la productividad de varios cultivos de interés económico para el país.

X. SUMMARY

The present work had as purpose to gather, to isolate, to select, to identify and characterization morfologic and molecular of native strains of *Trichoderma spp* of most important banana areas of the country, with potential of being used as alternative control for the Black Sigatoka of the banana crop. The antagonistic potential of *Trichoderma spp* in front of the agent causal *Mycosphaerella fijiensis* Morelet whose imperfect form is denominated *Paracercospora fijiensis* Morelet, was evaluated by test of inhibitory action *in vitro*. 11 strains of *Trichoderma spp.* were analyzed gathered of different banana areas of the country and 3 strains of *Trichoderma spp.* of the bank of strains of the Plant Phatology Laboratory (IASA II). The best antagonistic control of *Trichoderma spp.* against the pathogen *Paracercospora fijiensis* was obtained with the treatments T4, T9 and T11 corresponding to the strains gathered in the towns of Paisaje, Machala and Bonanza. These treatments presented significant statistical differences between 84% and 90%. By technicals of molecular characterization it was determined that the strains gathered in the banana towns of Machala and Bonanza belong to the group of *Trichoderma asperellum* and the stump gathered in the banana town of Paisaje they correspond to the group of *Trichoderma viride*. This study is a preliminary phase of investigations that will serve for finally to be able formulate a biofungicide that allows to control the pathogens that diminish the productivity of several cultivations of economic interest for the country.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de la captura y aislamiento de hongos en estudio



Fotos 1.y 2 - Captura y Aislamiento del hongo patógeno causante de la enfermedad.
Foto 3.- Obtención del hongo antagonista *Trichoderma spp.* Foto 4.- Discos para la determinación del ensayo de inhibición *in vitro*.

Anexo 2. Medio selectivo para captura de *Trichoderma spp.*

Ingredientes	Cantidad
Nitrato de calcio	1,0 g
Nitrato de potasio	0,25 g
Sulfato de magnesio	0,25 g
Fosfato de potasio	0,25 g
Cloruro de calcio	1,0 g
Ácido cítrico	0,05 g
Sacarosa	2,0 g
Agar	25,0 g
Agua	1 litro
Sulfato de estreptomicina	0,005 g
Mancozeb	0,003 g
Alcohol etílico	0,50 ml

Anexo 3. Metodologías de extracción de ADN

Metodología propuesta por Kim *et al.* 1992 modificada por Lee 2000 y Argoti, 2007, para extracción de ADN de hongos.

1. Colocar 4 ml de agua destilada estéril en la caja petri con micelio de siete días de crecimiento y se deposita en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y centrifugar a 13000 rpm por 30 minutos y eliminar el sobrenadante.
2. Al tubo Eppendorf que contiene el micelio añada 500 μ L de buffer CTAB.
3. Añada 1,5 μ L de proteinasa K a cada muestra (0.1 mg/ml) e incube a 65° C por una hora a baño maría.
4. Añada 700 μ L de fenol –cloroformo-alcohol isoamil (25:24:1) y centrifugue a 13000 rpm por 30 minutos.
5. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo y añada 1 volumen de fenol –cloroformo-alcohol isoamil (25:24:1) y centrifugue a 13000 rpm por 15 minutos. Retire el sobrenadante.
6. Trate el sobrenadante con 1 μ L de RNA asa (50 μ g/ml) e incube por una hora a 37 °C.
7. Añada 1 volumen de Cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) y centrifugue a 13000 rpm por quince minutos. El sobrenadante transfiera a otro tubo.
8. Añada 25 μ L de acetato de sodio 3M y 500 μ L de isopropanol helado y se deja en incubación toda la noche a -20 °C, centrifugue a 13000 rpm por 15 minutos. Elimine el sobrenadante.

9. Añada 400 μ L de etanol 75% y centrifugue a 13000 rpm por 10 minutos. Elimine el alcohol y deje secar al ambiente por 150 minutos.
10. Resuspenda el pellet de ADN en 50 μ L de TE e incube a -20° C.
11. Una vez que se agrega Tris - Cl - DTA (TE) es necesario preparar el mix para PCR.

Metodología de extracción modificada por Cobos 2009.

1. De una caja con micelio de siete días de crecimiento recolectar con la ayuda de un palillo redondo de madera estéril todo el micelio posible y depositarlo en un tubo Eppendorf de 2.0 ml, hasta que llegue a 1ml. Para que se deshidrate llevar a -80° C por una noche.
2. Macere el micelio directamente en el tubo Eppendorf con el homogenizador mecánico por unos 2 minutos. Posteriormente añada 300 μ L de buffer CTAB (200mM Tris- HCL, pH 8.0; 25mM EDTA, pH 8.0; 250mM de NaCL; 1% SDS; 1% β - mercaptoetanol, 2% CTAB (N-cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide) y vuelva a macerar con el homogenizador mecánico.
3. Agregar 400 μ L de CTAB y realizar un vortex de 1 minuto aproximadamente
4. Añada 10 μ L de proteinasa K a cada muestra (20mg/ml), realice otro vortex de 30 segundos e incube a 65° C por una hora a 1000 rpm en el termobloque. Cada 15 minutos dar pequeños vortex de 1 minuto.
5. Añada 700 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamil (25:24:1) y centrifugue a 13000 rpm por 35 minutos. Vortex por 1 minuto

6. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo y añada 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamil (25:24:1) y centrifugue a 13000 rpm por 20 minutos. Retire el sobrenadante.
7. Trate el sobrenadante con 2 μ L de RNAasa (50 μ g/mL) e incube por 1 hora a 40°C a 700 rpm en el termobloque. Dar un pequeño vortex de 10 segundos
8. Añada 1 volumen de Cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) y centrifuge a 13000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante transfiera a otro tubo.
9. Añada 700 μ L de isopropanol al 100% helado y se deja en incubación toda la noche -80°C, centrifuge a 13000 rpm por 15 minutos. Elimine el sobrenadante.
10. Añada 400 μ L de etanol 75% y centrifuge a 13000 rpm por 10 minutos (en centrifuga refrigerada a 4°C). Agite levemente con la mano los tubos por 10 segundos.
11. Repetir el paso anterior. Posteriormente elimine el alcohol y deje secar al ambiente por 20 minutos.
12. Resuspenda el pellet de ADN en 100 μ L de TE .
13. Llevar la resuspensión al termobloque a 37°C y a 400rpm por una hora e incube a -80° C

Anexo 4. Metodología aplicada para la realización de los Geles de Agarosa en Electroforesis

Electroforesis horizontal en geles de agarosa

Una vez extraído el ADN se procede a visualizarlo mediante una electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se utiliza un voltaje de 120v por 1 hora.

Para la preparación del gel se pesa una cantidad apropiada de agarosa dependiendo de la concentración requerida y se disuelve en buffer TAE ó TBE. Se agita la solución por 10 minutos en un stir hot plate para permitir que la agarosa se hidrate. Luego se lleva la solución a ebullición por 1 min y se deja homogenizar. Se repite este paso dos veces. Posteriormente se deja enfriar hasta que alcance los 55°C y se añade 0.5 ul de bromuro de etidio (10mg/mL) por cada 10 ml de solución. Finalmente se vierte en un molde plástico previamente armado que conste de una peineta con pocillos de tamaño conocido.

Una vez solidificado el gel, se sumerge en un tanque de electroforesis horizontal lleno con la misma buffer utilizada en la preparación. En general se pueden usar diferentes buffers, pero las más frecuentes son:

- Tris acetato EDTA buffer (TAE): 40mM tris base, 20mM ácido acético, 1mM EDTA.
- Tris borato EDTA buffer (TBE): 89mM tris base, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA. Mayor capacidad amortiguadora que TAE y se usa para fragmentos de hasta 12,000pb (Surzycky, 2000)

Posteriormente se procede a cargar las muestras en los pocillos del gel para lo cual se homogeniza 10ul de ADN con 2 ul de buffer de carga (Blue juice 10X) el cual tiene tres funciones principales: detener reacciones enzimáticas, proveer densidad y color a las muestras (Surzycky, 2000).

Paralelo a la corrida de las muestras, es necesario cargar en el gel un marcador de peso molecular conocido, para poder determinar el tamaño de las bandas. Para visualizar los resultados se utiliza un fotodocumentador UVP BioDoc It con cámara digital CCD que emite radiación UV a una longitud de onda de 365 nm al cual el bromuro de etidio emite fluorescencia

Anexo 5. Protocolo empleado para Reacción de la Cadena de Polimerasa

REACCIÓN DE PCR

Reacción PCR	Inicial	1X
Buffer	10x	5 uL
MgCl ₂	50 mM	2 uL
dNTP'S	25 mM	0,4 uL
ITS 1	100 pmol	0,25 uL
ITS 4	100 pmol	0,25 uL
Taq	5 U/uL	0,4 uL
Agua ° PCR	-	33,7 uL
Muestra	8 uL	
Volumen Final	50 uL	

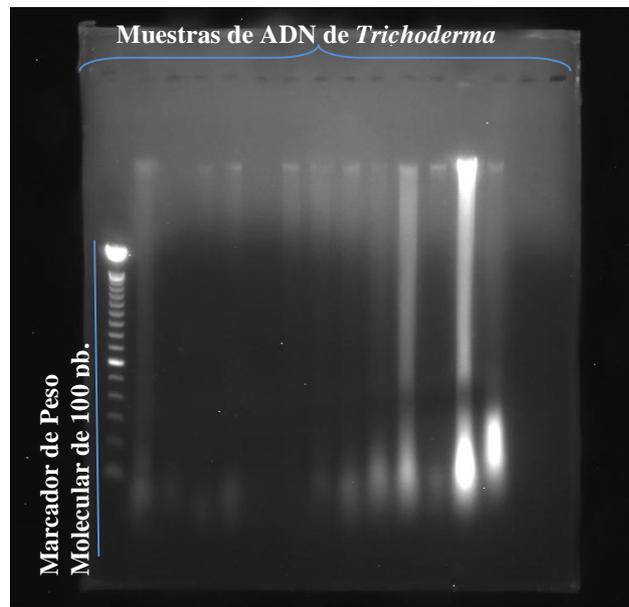
PROGRAMA PCR : TERMOCICLADOR

Desnaturalización previa	94°C	5 minutos	35 ciclos
Desnaturalización	94°C	1 minuto	
Hibridación	54°C	30 segundos	
Polimerización	72°C	1 minuto	
Extensión Final	72°C	7 minutos	
Reposo	4°C	10 minutos	

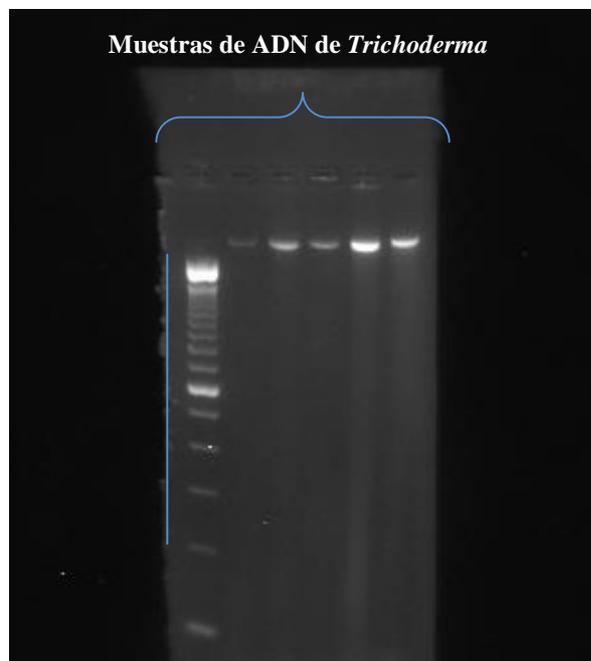
Anexo 6. Codificación de las cepas de *Trichoderma spp.* aisladas

Nº	LOCALIDAD	CÓDIGO
1	Quininde	Qn
2	Yamile	Ym
3	La Union	Lu
4	Paisaje	PJ
5	Congoma	Cnga
6	San Ignacio	SI
7	Vilmita	Vm
8	La Maná	Lm
9	Machala	Mch
10	San Gabriel	SnG
11	Bonanza	Bnza
12	Espe	Cepa 9
13	Espe	Cepa MT
14	Espe	Cepa SG
15	Testigo Absoluto	<i>Paracercospora</i>

Anexo 7. Corridas de gel de agarosa con muestras de extracción de ADN



Corrida de gel con 13 muestras de extracción de DNA.



Bandas Marcadas de ADN

Anexo 8. Procedimientos para identificación de muestras usando programas bioinformáticos

The screenshot shows an Excel spreadsheet with the following sections and content:

- Type of Sequencing:** A diagram showing the flow from 'Sample type' (DNA, PCR products (non-purified), PCR/purification, Purification, Sequencing, Single-extension).
- Comments on the Samples:** A large empty text area for sample details.
- Reaction Information:** A table with columns for 'Sample Name', 'Name of Seq primer', and 'DNA concn. (µg/ul)'. It lists 12 samples with their respective primers (ITS1 or ITS4).
- Instructions and Notes:**
 - Yellow box: 'If you have more than 2 different types of samples or sequencing reactions, please use another sample sheet by clicking another tab in the order sheet file.'
 - Yellow box: 'Purification: PCR were already done by customer, but they are not yet purified. Macrogen purifi Not necessary: No PCR or purification is necessary. The samples are already ready to be seq'
 - Yellow box: 'Describe freely about the detailed information about your samples, if necessary.'
 - Yellow box: 'DNA: All types of DNA. Cells in Glycerol: Cells are suspended in glycerol/media. Agar plate: Cell are on the surface(in the middle) of solid agar media'
 - Yellow box: 'Important Note: Each number indicates individual sequencing reactions. So please fill in every single reaction in every line to prevent from any error that can be caused by misinterpretation. (ex, Line 1: pGAD4 - M13F Line 2: pGAD4 - M13R)'
 - Yellow box: 'If DNA samples were lyophilized, please write the amount of DW to make 50ng/ul in final.'

Registro para el envío de muestras

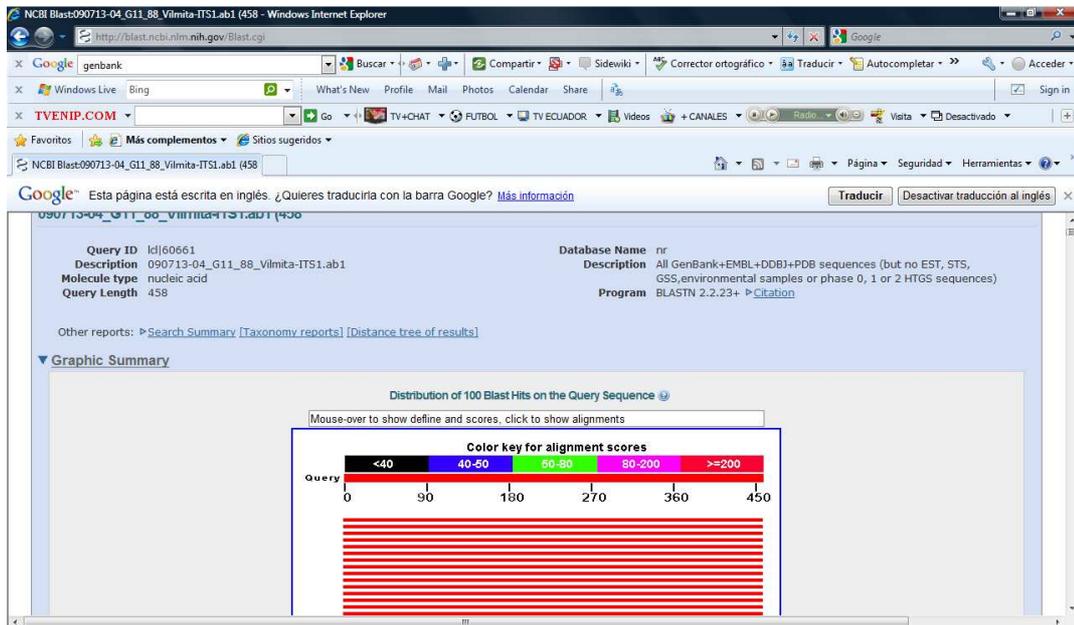
The screenshot shows the NCBI BLAST search interface with the following details:

- Browser:** Windows Internet Explorer.
- URL:** http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
- Search Type:** Enter Query Sequence.
- Query Sequence:**

```

AGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAACITTCACCAACGGAATCTGTTGGTCTGGCATCGAT
GAGAACCGCGCAAAATCGGTAAGTATGTAATTCGCAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA
CGCAATTTCGCGCCGATATTTCTGGGSCATGCTCTCGAGGCTGATTCGAACCTCGAACC
CTCCGAGGATCGGCTTGGGATCGGSCCTCCACAGGCTGCGGCGCCGGAATACAGTGGCG
TCTCGCGAGCTCTCCGCGCANTATTGCAACAATCGCAACCGGAGCGCGCG
                    
```
- Job Title:** 090713-04_G11_88_Vilmita-ITS1.ab1
- Database:** Non-redundant protein sequences (nr)
- Organism:** Optional field for organism name.
- Exclude:** Models (XM/XP) and Uncultured/environmental sample sequences.

Ingreso de datos en formato Fasta al NCBI.



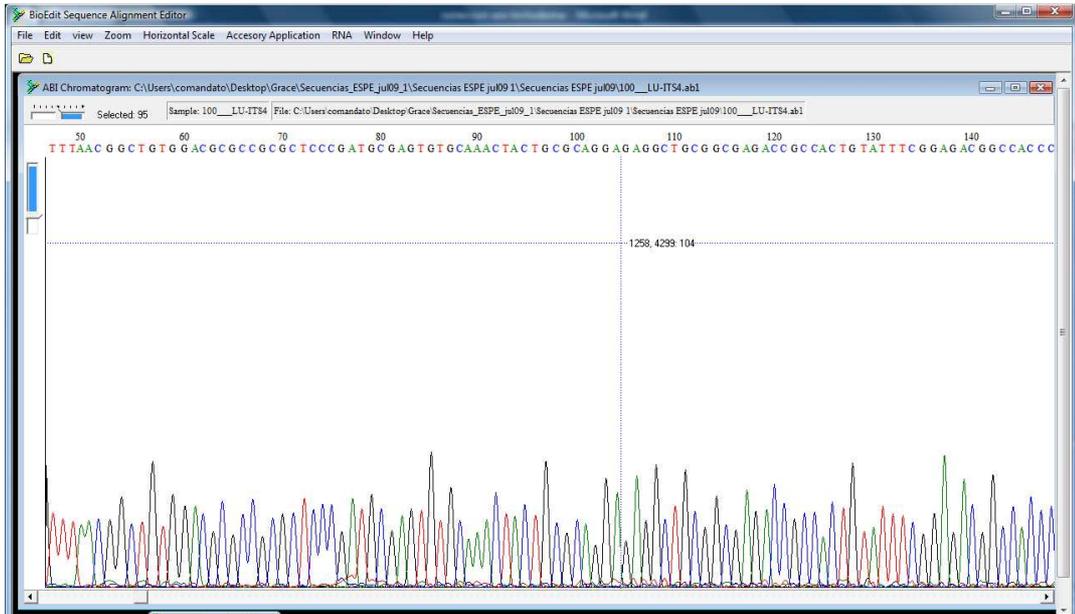
Análisis de los datos ingresados

Descriptions

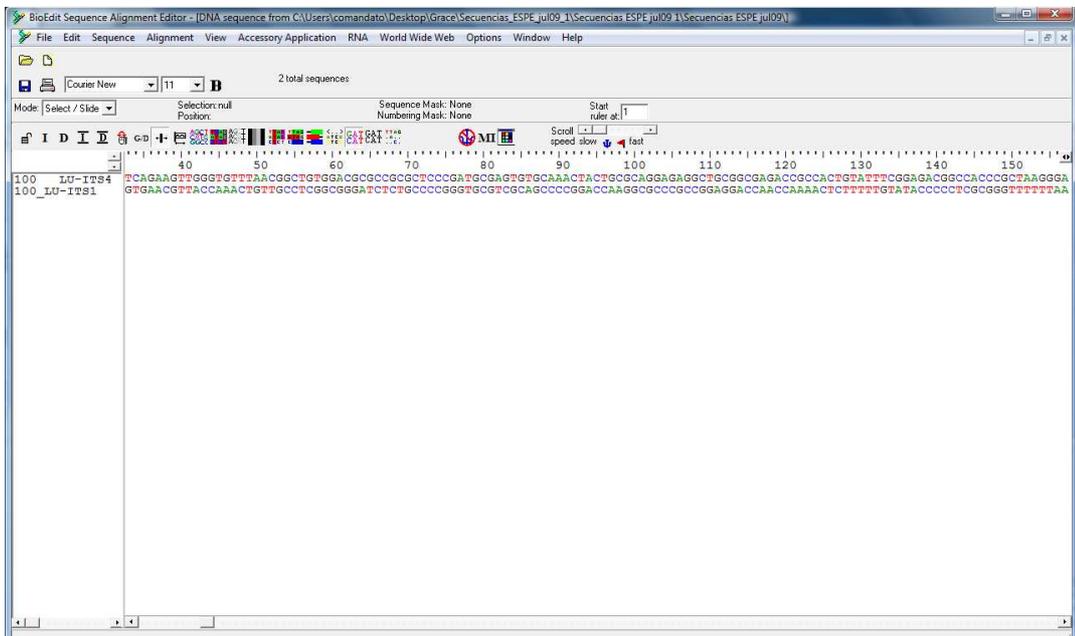
Legend for links to other resources: [UniGene](#) [GEO](#) [Gene](#) [Structure](#) [Map Viewer](#)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
GU176467.1	Trichoderma asperellum strain T186 18S ribosomal RNA gene, parti	833	833	100%	0.0	99%	
GU176454.1	Trichoderma asperellum strain T77 18S ribosomal RNA gene, parti	833	833	100%	0.0	99%	
GU176452.1	Trichoderma asperellum strain T52 18S ribosomal RNA gene, parti	833	833	100%	0.0	99%	
GU176451.1	Trichoderma asperellum strain T51 18S ribosomal RNA gene, parti	833	833	100%	0.0	99%	
GU176445.1	Trichoderma asperellum strain T29 18S ribosomal RNA gene, parti	833	833	100%	0.0	99%	
GU176439.1	Trichoderma asperellum strain T8 18S ribosomal RNA gene, partial	833	833	100%	0.0	99%	
GU176437.1	Trichoderma asperellum strain T5 18S ribosomal RNA gene, partial	833	833	100%	0.0	99%	
GU479398.1	Trichoderma asperellum isolate NB411(N)ASS 12A-Ta 18S ribosoma	830	830	100%	0.0	99%	
GU594651.1	Trichoderma asperellum strain TA 07 18S ribosomal RNA gene, part	830	830	100%	0.0	99%	
GU138302.1	Trichoderma vunnanense strain CBS 121219 18S ribosomal RNA ge	830	830	100%	0.0	99%	
GU138301.1	Trichoderma sp. GJD-2009a strain GJS 04-116 18S ribosomal RNA (830	830	100%	0.0	99%	
GU138300.1	Trichoderma sp. GJD-2009a strain GJS 04-310 18S ribosomal RNA (830	830	100%	0.0	99%	
GU138299.1	Trichoderma sp. GJD-2009a strain GJS 04-16 18S ribosomal RNA (830	830	100%	0.0	99%	
GU138298.1	Trichoderma sp. GJD-2009a strain GJS 04-110 18S ribosomal RNA (830	830	100%	0.0	99%	
GU138297.1	Trichoderma sp. GJD-2009a strain GJS 04-109 18S ribosomal RNA (830	830	100%	0.0	99%	
GU138286.1	Trichoderma sp. GJD-2009a strain GJS 06-159 18S ribosomal RNA (830	830	100%	0.0	99%	
GU138285.1	Trichoderma sp. GJD-2009a strain GJS 04-72 18S ribosomal RNA (830	830	100%	0.0	99%	
GU318216.1	Trichoderma asperellum strain Z3PH0810 18S ribosomal RNA gene,	830	830	100%	0.0	99%	

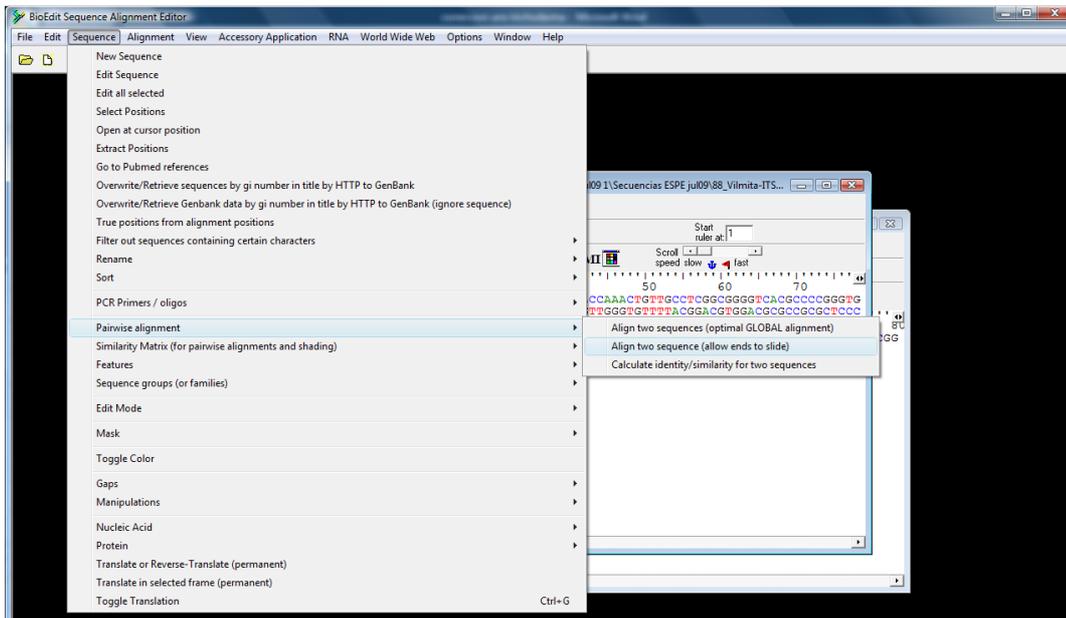
Búsqueda en el banco de genes mundial, similitud de porcentaje con especie *Trichoderma asperellum* 99%.



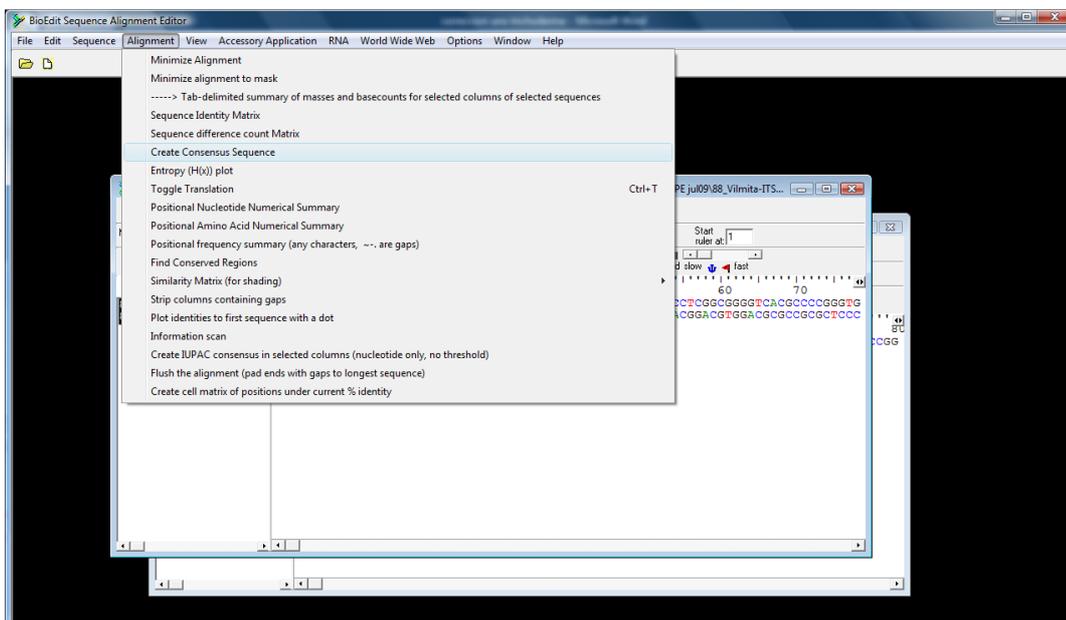
Picos de la secuencia de una de las muestras amplificadas en dirección Forward and reverse.



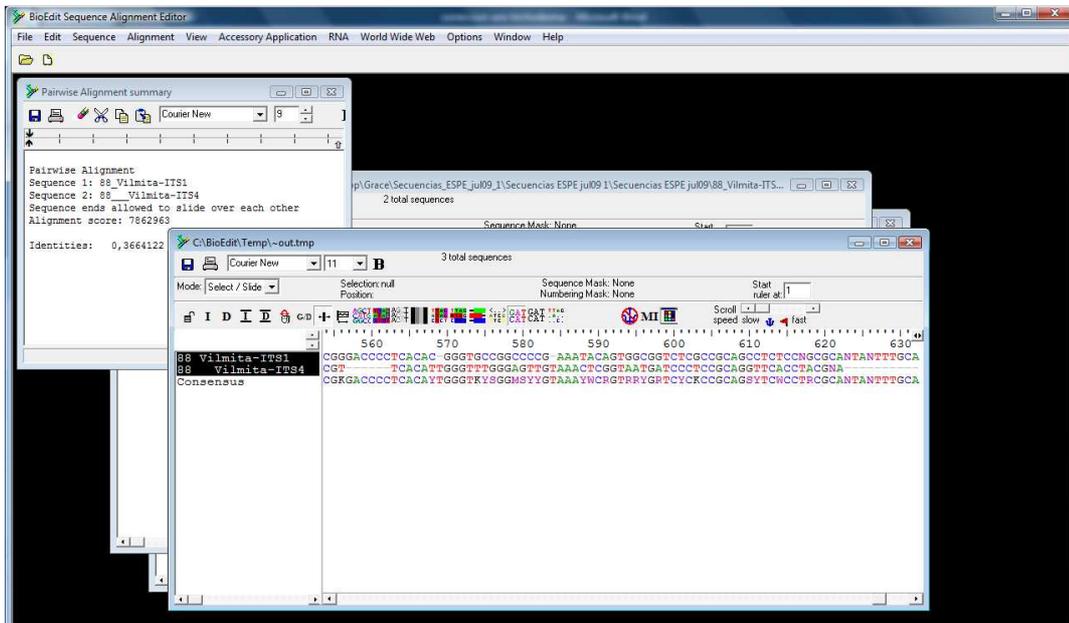
Secuencia de una de las muestras ITS1 – ITS4.



Alineación de las dos secuencias forward and reverse de una muestra



Creación de la secuencia consenso



Secuencia consensus creada