



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

INSTITUTO DE POSGRADO

MAESTRÍA EN GESTIÓN SUSTENTABLE DE RECURSOS NATURALES

Desarrollo de un bioproceso para la conservación de cepas nativas de *Trichoderma spp.*, a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana.

Tesis presentada en opción de Máster en Gestión Sustentable de Recursos Naturales

Autor: Benavides Sotelo, Edmundo Napoleón

Director: Pineda Insuasti, Julio Amilcar, PhD.

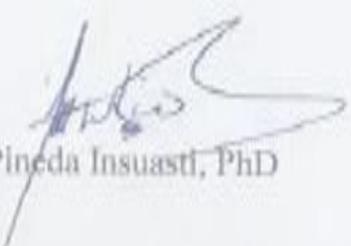
Ibarra – Ecuador

2017

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de tutor del Trabajo de Grado, presentado por el Ingeniero Edmundo Napoleón Benavides Sotelo, para optar por el grado de Magister en Gestión Sustentable de Recursos Naturales, doy fe de que dicho trabajo reúne los requisitos y meritos suficientes para ser sometido a presentación (pública o privada) y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Ibarra, a 04 días del mes de agosto del 2017

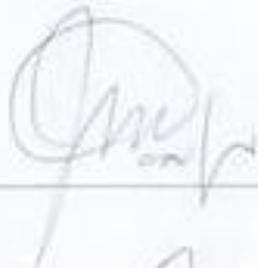


Ing. Julio Pineda Insuasti, PhD

**Desarrollo de un bioproceso para la conservación de cepas nativas de *Trichoderma spp.*,
a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana.**

Por: Edmundo Napoleón Benavides Sotelo

Trabajo de Grado de Maestría aprobado en nombre de la Universidad Técnica del Norte, por
el siguiente jurado, a los 04 días del mes de agosto del 2017.

Doctor. José Manuel País Chanflau	
Magister Jimmy Núñez Pérez	
Magister Lennys Berutti	

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy.

A mis hijos Melany, Aarón, Dairys quienes son mi inspiración para seguir luchando día a día.

A mis padres y familia por ser el pilar fundamental en todo lo que soy y por todo su apoyo.

A Patricia Maribel por su apoyo incondicional.

Este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

AGRADECIMIENTO

Al Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), al Ingenio Azucarero del Norte (IANCEN) y a la Universidad Técnica del Norte (UTN).

A Julio Pineda, por brindar el apoyo constante, por sus ideas y recomendaciones durante la elaboración y ejecución del presente trabajo.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
INSTITUTO DE POSTGRADO
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA
UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

La Universidad Técnica del Norte dentro del proyecto Repositorio Digital Institucional, determinó la necesidad de disponer de textos completos en formato digital con la finalidad de apoyar los procesos de investigación, docencia y extensión de la Universidad.

Por medio del presente documento dejo sentada mi voluntad de participar en este proyecto, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	0401528518		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Benavides Sotelo Edmundo Napoleón		
DIRECCIÓN:	Pichincha 08-37 y Sucre El Ángel - Carchi		
EMAIL:	napoleon_nn@yahoo.es		
TELÉFONO FIJO:	062977320	TELÉFONO MÓVIL:	0982484485

DATOS DE LA OBRA	
TITULO:	Desarrollo de un bioproceso para la conservación de cepas nativas de <i>Trichoderma spp.</i> , a partir de la biodiversidad fúngica ecuatoriana.
AUTOR (ES):	BENAVIDES SOTELO EDMUNDO NAPOLEÓN
FECHA:	04 de agosto del 2017
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA	<input type="checkbox"/> PREGDRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	Magister en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales
ASESOR / DIRECTOR	Ing. Julio Amilcar Pineda Insuasti, (PhD)

2. AUTORIZACIÓN DE USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD

Yo, Edmundo Napoleón Benavides Sotelo, con cédula de ciudadanía Nro. 0401528518, en calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales de la obra o trabajo de grado descrito anteriormente, hago entrega del ejemplar respectivo en formato digital y autorizo a la Universidad Técnica del Norte, la publicación de la obra en el Repositorio Digital Institucional y uso del archivo digital en la Biblioteca de la Universidad con fines académicos, para ampliar la disponibilidad del material y como apoyo a la educación, investigación y extensión; en concordancia con la Ley de Educación Superior Artículo 144.

3. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, al 04 de agosto del 2017

EL AUTOR:



Edmundo Napoleón Benavides Sotelo

C.C.: 0401528518

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Yo, Benavides Sotelo Edmundo Napoleón, con cédula de ciudadanía Nro. 0401528518 manifiesto mi voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor del trabajo de grado denominado: “Desarrollo de un bioproceso para la conservación de cepas nativas de *Trichoderma spp.*, a partir de la biodiversidad fúngica Ecuatoriana”, que ha sido desarrollado para optar por el título de Magíster en Gestión Sustentable de los Recursos Naturales, en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.



Edmundo Napoleón Benavides Sotelo

C.C.: 0401528518

RESUMEN

Trichoderma spp., es un mohó cosmopolita, que se encuentra de forma natural en plantas, rizosferas, sedimentos, entre otros sustratos. Dentro de sus principales aplicaciones se encuentra su uso como biocontrolador y/o biofertilizante en cultivos agrícolas, gracias a su actividad antagonista hacia fitopatógenos. Adicionalmente produce otra serie de compuestos de gran valor biotecnológico. Muchas industrias requieren de cepas puras de *Trichoderma spp.*, siendo esta la razón de ser de los Centros de Recursos Genéticos (CRG), quienes deben mejorar continuamente para garantizar la calidad de las cepas y brindar la información pertinente para su manejo. El objetivo de este trabajo es presentar información básica para la obtención de cepas puras de *Trichoderma spp.*, que permita a los CRG ajustarse a los requerimientos de la industria y dar el máximo aprovechamiento a la biodiversidad endógena. Se concluye que para la obtención de cepas puras con fines industriales se pasa por cuatro etapas: aislamiento, identificación, caracterización y conservación. Siendo la primera y la cuarta Puntos Críticos de Control (PCC), ya que una mala identificación asigna propiedades a cepas erróneamente y una mala conservación pone en juego la integridad fenotípica y genómica de la cepa. Estos PCC dejan en riesgo la viabilidad económica de la industria que haya adquirido la cepa.

Trichoderma spp. es un hongo habitante natural del suelo, que ha mostrado ser un efectivo biocontrolador de hongos fitopatógenos. La producción de biopreparados a partir de las esporas de este hongo contribuye al desarrollo sostenible de la agricultura y permite ofertar alimentos libres de fungicidas a los consumidores. Por ello, el objetivo de este trabajo fue describir aspectos claves de la producción de biopreparados de *Trichoderma spp.*, mediante una revisión de la literatura que permita el óptimo aprovechamiento de los recursos locales. Los biopreparados se pueden producir por fermentación sólida, líquida agitada, líquida

estática o bi-fásica; y su eficiencia depende principalmente de la concentración de inóculo y la viabilidad-estabilidad de las esporas en el tiempo. Adicionalmente deben presentar bajos costos de producción, por lo que el empleo de residuos agroindustriales es una buena alternativa.

Se utilizó el laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales – FICAYA de la Universidad Técnica del Norte, se utilizó el equipo “VirTis wizard 2.0”, con un vacío de 300 atm durante 32 horas a una temperatura de -40 °C y 40 °C. Las cepas puras liofilizadas fueron trasladadas al banco de recursos genéticos del Centro Ecuatoriano de biotecnología y ambiente – CEBA; para la recuperación de las cepas liofilizadas se utilizó la metodología propuesta por la Colección Española de Cultivos Tipo obteniendo cepas viables, el protocolo establecido permitirá la conservación de este recurso fúngico nativo.

Para determinar la velocidad de crecimiento radial y el medio de cultivo en el que obtiene mejor desarrollo de *T. asperellum* se utilizó cepas puras que se obtuvieron en los anteriores experimentos y que se encuentran en el banco de recursos genéticos del CEBA, la cepa utilizada es la de código CEBA-IIIE-TA-010116; se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), los factores de estudio fueron medios de cultivo PDA y MEA, con 11 replicas, la variable de respuesta velocidad de crecimiento radial a una temperatura constante de 22° C, durante seis días, se realizó una ANOVA en la que se concluye que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de velocidad, entre un nivel de medios y otro al 95% de confianza. Se utilizó pruebas de múltiples rangos para determinar en cuál de las variables estudiadas existe diferencia de los medios. Una vez realizado el análisis estadístico se concluye que el mejor medio de cultivo para *T. asperellum* es Agar Papa Dextrosa (PDA) con 8,15 mm/día de velocidad de crecimiento radial por día.

El catálogo y ficha fueron adaptados a la metodología presentada por el CECT y el Catálogo de cepas microbianas del ICIDCA.

Palabras clave: Biocontrolador, fermentación, viabilidad, estabilidad, PCC, CRG, DCA, cepas viables, aplicaciones industriales, conservación, identificación, CECT, ICIDCA.

SUMMARY

Trichoderma spp., is a cosmopolitan mold, found naturally in plants, rhizospheres, sediments, among other substrates. Among its main applications is its use as biocontrol and / or biofertilizer in agricultural crops, thanks to its antagonistic activity towards phytopathogens. In addition it produces another series of compounds of great biotechnological value. Many industries require pure strains of *Trichoderma spp.*, Which is the raison d'être of the Genetic Resources Centers (CRG), which must be continually improved to guarantee the quality of the strains and provide relevant information for their management. The objective of this work is to present basic information to obtain pure strains of *Trichoderma spp* that allows the CRG to adjust to the requirements of the industry and to give maximum use to the endogenous biodiversity. It is concluded that for the production of pure strains for industrial purposes it goes through four stages: isolation, identification, characterization and conservation. Being the first and fourth Critical Control Points (CCPs), since poor identification assigns properties to strains erroneously and poor conservation puts into play the phenotypic and genomic integrity of the strain. These CCPs jeopardize the economic viability of the industry that purchased the strain.

Trichoderma spp., is a naturally occurring soil fungus, which has been shown to be an effective biocontroller of phytopathogenic fungi. The production of biopreparates from spores of this fungus contributes to the sustainable development of agriculture and allows to offer fungicide-free foods to consumers. Therefore, the objective of this work was to describe key aspects of the production of biopreparates of *Trichoderma spp.*, through a review of the literature that allows optimum use of local resources. Biopreparats can be produced by solid, liquid, stirred, static or bi-phasic fermentation; and its efficiency depends mainly on the

inoculum concentration and the viability-stability of the spores over time. In addition, they must have low production costs, so the use of agro-industrial waste is a good alternative.

We used the laboratory "VirTis wizard 2.0", with a vacuum of 300 atm for 32 hours at a temperature of -40 °C and 40 °C. The laboratory was used in the Faculty of Agricultural and Environmental Sciences - FICAYA of the Universidad Técnica del Norte. . The lyophilized pure strains were transferred to the genetic resources bank of the Ecuadorian Center for Biotechnology and Environment - CEBA; for the recovery of lyophilized strains, the methodology proposed by the Spanish Collection of Type Crops was obtained, obtaining viable strains, the established protocol will allow the conservation of this native fungal resource.

In order to determine the linear growth rate and the culture medium in which the best development of *T. asperellum* is obtained, we used pure strains obtained from the previous experiments and found in the genetic resources database of the CEBA, the strain used is The code CEBA-III- TA-010116; We used a completely randomized design (DCA), study factors were PDA and MEA culture media, with 11 replicates, the response variable radial growth rate at a constant temperature of 22 ° C, for six days, we performed a ANOVA in which it is concluded that there is a statistically significant difference between the means of speed, between a level of means and another one to 95% confidence. Multiple-rank tests were used to determine in which of the variables studied there is difference of means. Once the statistical analysis was carried out, it was concluded that the best culture medium for *T. asperellum* is Papa Dextrose Agar (PDA) with 8.15 mm / day of radial growth rate per day.

The catalog and datasheet were adapted to the methodology presented by the CECT and the Catalog of microbial strains of ICIDCA.

Key words: Biocontrol, fermentation, viability, stability, PCC, CRG, DCA, viable strains, industrial applications, conservation, identification, CECT, ICIDCA.

TABLA DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN.....	vi
CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE	ix
RESUMEN.....	x
SUMARY	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1.1 La crisis de los plaguicidas: un desafío mundial	7
1.2 Situación actual.....	9
1.3 Situación futura.....	12
1.4 La crisis de los plaguicidas: un desafío local.....	13
1.4.1 Situación Latinoamericana.	13
1.4.2 Ecuador.....	14
1.4.3 Zona 1.....	16
1.5 Propuesta al desafío: biocontroladores	17
1.6 Trichoderma.....	20
1.6.1 Aislamiento de cepas.	22
1.6.2 Identificación de especies.	24
1.7 Caracterización	26
1.7.1 Tasas de crecimiento	26

1.7.2	Producción de metabolitos	28
1.7.3	Efecto antagónico	29
1.8	Conservación de cepas.....	31
1.9	Producción de biopreparados.....	32
1.9.1	Producción por Fermentación en Estado Sólido	33
1.9.2	Producción por Fermentación Líquida:	36
1.9.3	Parámetros de control.....	37
1.10	Catálogo de cepas	39
2.	ESTUDIO EXPERIMENTAL	41
2.1	Aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa de <i>Trichoderma spp.</i> ...	41
2.1.1	Materiales y métodos.....	41
2.1.2	Resultados.....	44
2.1.3	Discusión	49
2.2	Protocolo de conservación para la especie <i>Trichoderma asperellum</i> por liofilización.	50
2.2.1	Materiales y métodos.....	50
2.2.2	Resultados.....	52
2.2.3	Discusión	55
2.3	Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de <i>Trichoderma asperellum.</i>	55
2.3.1	Materiales y métodos.....	55
2.3.2	Resultados.....	56
2.3.3	Discusión	60
2.4	Catálogo de cepas puras de <i>Trichoderma spp.</i>	61
2.4.1	Uso de catálogo	61
2.4.2	Medios de cultivos.....	61
2.4.3	Medios y condiciones de cultivo de <i>Trichoderma asperellum</i>	62

2.4.4	Formula medio de cultivo	63
2.4.5	Suministro de cultivos	63
2.4.6	Conservación de los cultivos	63
2.4.7	Identificación.....	63
2.4.8	Depósito de cultivos	64
2.4.9	Precios de cepas y otros servicios	64
2.4.10	Listado de Trichodermas disponibles	64
2.4.11	Descripción de las cepas.....	65
2.4.12	Recuperación de cultivos liofilizados.....	67
2.4.13	Especificaciones de cultivos microbianos	67
2.4.14	Ficha para el depósito de cepas en el banco de recursos genéticos	68
3.	CONCLUSIONES	69
4.	RECOMENDACIONES	71
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
	ANEXOS.....	99

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivos reportados para el aislamiento de <i>Trichoderma spp.</i>	24
Tabla 2. Metabolitos producidos por las especies de <i>Trichoderma spp.</i>	28
Tabla 3. Fitopatógenos objetivo del Biocontrolador <i>Trichoderma spp.</i>	30
Tabla 4. Sustratos empleados para la producción de esporas de <i>Trichoderma spp.</i>	35
Tabla 5. Códigos de muestras de <i>Trichoderma spp.</i>	43
Tabla 6. Resultados de la identificación.....	47
Tabla 7 Resultados del análisis proximal de <i>T. asperellum.</i>	49
Tabla 8 Resultados del análisis de Minerales Totales.....	49
Tabla 9. Tratamiento térmico (Thermal treatment).....	51
Tabla 10. Secado primario (Primary drying)	51
Tabla 11 Datos de la velocidad de crecimiento radial en los medios de cultivo	56
Tabla 12. Resumen Estadístico para Velocidad	57
Tabla 13. Tabla ANOVA para Velocidad por Medio	58
Tabla 14. Medias para Velocidad por Medio con intervalos de confianza del 95,0%	58
Tabla 15. Pruebas de Múltiple Rangos para velocidad por Medio, Método: 95,0 porcentajes LSD.	60
Tabla 16 Listado de cepas de <i>Trichoderma spp.</i>	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cortes efectuados en el árbol para la toma de muestras.	24
Figura 2. Crecimiento de colonias de diferentes cepas de <i>Trichoderma spp.</i>	26
Figura 3. Área de recolección de muestras de suelo.	41
Figura 4. Recolección de muestras de suelo en el cultivo de caña de azúcar.	43
Figura 5. Cultivos axénicos de <i>Trichoderma spp.</i>	44
Figura 6. Muestra de suelo recolectada en el cultivo de caña	45
Figura 7. Preparación de medios de cultivo PDA.	45
Figura 8. Esterilización de medios de cultivo	46
Figura 9 Preparación de muestras de suelo para inocular los medios de cultivo PDA y MEA.	46
Figura 10. Inoculación de medios de cultivo.	47
Figura 11, Cepas de <i>Trichoderma spp.</i> , obtenida en laboratorio.	47
Figura 12. Equipo liofilizador “VirTis wizard 2.0”	53
Figura 13. Valores del proceso automatizado del liofilizador.	54
Figura 14. Tubos con cultivo de <i>Trichoderma asperellum</i>	54
Figura 15. Cultivos de <i>Trichoderma asperellum</i> liofilizados.	55
Figura 16. Gráfico de medias para velocidad de crecimiento radial.	59
Figura 17. Medición de la velocidad de crecimiento de <i>Trichoderma asperellum</i>	60
Figura 18, Cultivo de <i>Trichoderma asperellum</i> en MEA y PDA.	64
Figura 19 <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	65
Figura 20 <i>Trichoderma viride</i>	65
Figura 21. Antagonismo de <i>Trichoderma asperellum</i>	65

INTRODUCCIÓN

El género *Trichoderma spp.* es un hongo cosmopolita, habitante natural de suelos con abundante materia orgánica y altas densidades de raíces, que también se puede encontrar asociados a la superficie de plantas y cortezas de madera descompuesta (Harman, 1990). Las especies de este género son de gran interés agrícola debido a las características antagónicas que presentan frente a hongos fitopatógenos; para ello ejecutan tres mecanismos de biocontrol: competencia por nutrientes o espacio, antibiosis y micoparasitismo (Bélangier, Dufour, Caron, & Benhamou, 1995; Chet, Ibar, & Hadar, 1997; Harman & Kubicek, 1998); siendo este último su mecanismo principal de acción (Fernández, 2001). Adicionalmente, está reportado que las celulasas producidas por este hongo son las más eficientes para la degradación de sustratos celulósicos en monómeros de glucosa (Esterbauer, Steiner, Labudova, Hermann, & Hayn, 1991). Por lo que se considera a *Trichoderma spp.* como uno de los hongos más útiles en la producción de enzimas industriales, la agricultura y la biorremediación (Rey, Llobell, Monte, Scala, & Lorito, 2004).

A pesar de que las especies de *Trichoderma spp.*, han sido evaluadas durante más de 70 años como antagonistas de hongos fitopatógenos, sólo hasta inicios del siglo XXI se empezaron a comercializar como biocontroladores agrícolas; probablemente a causa del cambio de los requerimientos del mercado de los alimentos, que exige cada vez más menor trazas de fungicidas en ellos. Las especies más comunes para este fin son *T. viride* y *T. harzianum* (Castro & Monte, 2000), que constituyen el ingrediente principal de los bioinsumos comercializados; siendo efectivos contra los hongos *P. nicotianae*, *R. solani*, *Pythium spp.*, *P. aphanidermatum*, *P. parasítica*, *P. capsici*, *R. rolfsii*, entre otros (Stefanova, 2003). Se conoce que aproximadamente el 90 % de los actuales micoplaguicidas para bio-

control de hongos fitopatógenos tiene como principio activo las esporas (conidios y clamidiosporas) de *Trichoderma spp.* (Fernandez-Larrea, 2001; Woo, Scala, Ruocco, & Lorito, 2006). El tratamiento de las semillas es la forma más extensiva del uso de *Trichoderma spp.* porque asegura la protección inmediata de la plántula naciente (Marusia, 1997). Harman, (2000) comparó el desarrollo de varias plantas con y sin aplicación de biocontroladores, demostrando que *Trichoderma spp.*, no sólo protege la planta sino que estimula su crecimiento y absorción de nutriente.

La producción de biopreparados fúngicos para control biológico agentes tiene como objetivo transportan el mayor número posible de propágulos (esporas, para este caso) viables que pueden infectar a los hongos patógenos. Para la formulación de biopesticidas estables las estructuras morfológicas deben permanecer viables durante mucho tiempo antes y después de uso, con un tiempo mínimo de caducidad de 18 meses a 20 ° C (Deshpande, 1999). Su uso contribuye al desarrollo sostenible de la agricultura, permite responder a la demanda orgánica de alimentos y la protege el entorno ecológico de la zona urbana (Marusia, 1997). Sin embargo, uno de las mayores limitaciones del su uso y comercialización es la formulación adecuada de los biopreparados, lo que implica, asegurar su fácil aplicación, bajos costos de producción, concentración suficiente de inóculo, viabilidad de las esporas (Fravel, 2005) y mantenimiento de la densidad de inóculo una vez que aplicado en el suelo o sustrato, tras un periodo de tiempo de medio a largo plazo (Martínez-Medina, Roldán, Lloret, & Pascual, 2008).

Bajo este contexto el objetivo de este trabajo es describir aspectos claves de la producción de biopreparados de *Trichoderma spp.*, mediante una amplia revisión de la literatura que permita el óptimo aprovechamiento de los recursos locales y promueva el uso de biocontroladores en el agro.

El ensayo sobre el Principio de la Población (Malthus, 1846) que afirma que la población aumenta exponencialmente mientras los alimentos se producen linealmente alarmó a la comunidad internacional, al igual que la obra de Ehrlich (1968) denominada la *Explosión Demográfica* o la *Bomba P*, que predecía una hambruna masiva a causa del aumento poblacional. A partir de allí los gobiernos implementaron políticas demográficas para frenar el aumento explosivo de la población, dado durante la primera mitad del siglo XX. Además, el auge de la revolución verde, que consistía en la siembra de variedades mejoradas de plantas y el uso de agroquímicos, permitió el aumento de los rendimientos de los cultivos (Sumpsi, 2012). No obstante, polémicas se desataron sobre la pertinencia de emplear agroquímicos para obtener estos resultados, ya que estudios afirmaron que la mala gestión de los agro-insumos afecta negativamente el medio ambiente y la salud de los trabajadores.

Situación problemática

Un pesticida o plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga (World Health Organization (WHO) y Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2010), y una plaga es cualquier planta, animal o microorganismo que aumenta su densidad de tal manera que perjudica directa o indirectamente al ser humano; para el caso de la agricultura, la afección se traduce en pérdidas económicas (Brechelt, 2010). El término plaguicida abarca una amplia gama de compuestos como insecticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, molusquicidas, nematocidas, reguladores del crecimiento de las plantas y otros (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009). Los pesticidas de mayor impacto son endosulfán, clorpirifós, cipermetrina (Ronco et al., 2008), lambdacialotrina, carbofurano y fipronil (Vieira, Noldin, Deschamps, y Resgalla, 2016).

Los plaguicidas constituyen contaminantes persistentes en el agua, el suelo y el aire, representando un riesgo para los seres vivos (Kommanet, 1998). En los animales inducen efectos adversos en las funciones reproductivas e inmunológicas; en plantas provocan

disminución de los rendimientos y mayor susceptibilidad a enfermedades; y en el suelo ocasionan pérdida de fertilidad, al resultar mortales para los microorganismos benéficos que participan en los ciclos de carbono y nitrógeno favoreciendo la absorción de nutrientes por las plantas. Los plaguicidas constituyen contaminantes persistentes, porque pueden encontrarse volatilizados en el aire, la lluvia, las nubes y la neblina (Aktar, Sengupta, y Chowdhury, 2009). Exposición prolongada a estos químicos puede ocasionar en el ser humano trastornos cardiopulmonares, neurológicos y hematológicos, enfermedades de la piel (Pingali, Marquez, Palis, y Rola, 1995), alteraciones endocrinas (Campos y Freire, 2016), hiperlipidemia en fetos (Monteagudo et al., 2016), entre otros malestares. Está reportado que muchas de las llamadas “nuevas enfermedades” son generadas por la inadecuada calidad de los alimentos (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2002) y que los factores ambientales son responsables de más del 24% de la carga mundial de enfermedad y de alrededor del 36 % de las muertes de los niños (Prüss-Üstün y Corvalán, 2005). La alimentación es la fuente de mayor nivel de exposición a residuos de pesticidas para los humanos; se reporta que es alrededor de 10^3 a 10^5 veces mayor que a la exposición en el aire y el agua (Margni, Rossier, Crettaz, y Jolliet, 2002).

Con el paso del tiempo, las plagas se han hecho resistentes a los pesticidas, haciendo necesario el empleo de dosis de más grandes para lograr el mismo efecto, lo que genera mayores costos de producción por concepto de aumento de los requerimientos de agroinsumos y mayor liberación de estos compuestos contaminantes al ambiente (Laxminarayan, 2003). El desequilibrio en el ecosistema de los cultivos agrícolas incide negativamente en la calidad de vida de los agricultores y la salud de los consumidores (Duarte, 2012). Una forma de cuantificar el impacto de dichos químicos es mediante el método de evaluación del ciclo de vida medioambiental (Margni et al., 2002).

Actualmente, el Ecuador se encuentra en zona de emergencia, las áreas de producción de maíz, ya que se prevé que los rendimientos caerán hasta en un 60 % durante el año 2016 a causa de enfermedades virales y fúngicas, por lo que habrá que importar el maíz para suplir la demanda nacional (Subsecretaría de Tierras y Reforma Agraria [STRA], 2016). En vista de la necesidad de aumentar la productividad agrícola y de que el Plan Nacional Para el Buen Vivir 2013-2017 plantea como séptimo objetivo nacional “Garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental territorial y global” y como octavo objetivo “Consolidar el sistema económico social y solidario, de forma sostenible” (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo [SENPLADES], 2013), es recomendable la Gestión Integrada de Plagas con agentes biológicos.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), firmado en la década de los 90’s (incluyendo a la CAN), declara la soberanía de los Estados sobre sus recursos genéticos y establece lineamientos para el acceso y uso de dichos recursos. Para el caso específico del Ecuador, existe el Grupo Nacional de Trabajo sobre Biodiversidad (GNTB), y dentro de él varios subgrupos como el de Bioseguridad y Acceso a Recursos Genéticos (Manosalvas, Estrella, Mariaca, & Ribadeneira, 2005), alineados a la Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030 (Ministerio del Ambiente del Ecuador [MAE], 2015). Se evidencia la importancia de los Bancos de Recursos Genéticos (BRG) con cepas potenciales para uso como bioinsumos, lográndose identificar y conservar las especies para su estudio y/o posterior selección con fines industriales.

Problema científico

Existe limitado conocimiento en el manejo y conservación de *Trichoderma spp.*, haciéndose necesario establecer un protocolo que permita la conservación de la cepa nativa. En el Ecuador no se le ha dado la debida importancia al estudio de los hongos, tomando en cuenta que el reino fungi es uno de los que cumplen un papel vital en la naturaleza, no se

evidencian estudios específicos que aporten a la conservación de la biodiversidad fúngica nativa, que a su vez se ve amenazada por el uso de especies exóticas que se venden en las casas comerciales y que podrían desplazar a las nativas.

Objeto

Proceso de conservación de *Trichoderma spp.*, nativa ecuatoriana.

Campo

Manejo de recursos naturales, recursos genéticos, biodiversidad fúngica, biotecnología.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar un proceso tecnológico a escala de laboratorio para la conservación de cepas nativas de *Trichoderma spp.*, mediante bioprocesos que permita la conservación del recurso natural fúngico y su aprovechamiento sustentable.

Objetivos específicos

- Aislar, identificar y caracterizar la especie de *Trichoderma spp* nativa.
- Desarrollar un protocolo para la conservación de *Trichoderma spp.*
- Seleccionar el mejor medio de cultivo para el crecimiento de la cepa aislada de *Trichoderma spp.*, a través de la velocidad de crecimiento radial.
- Diseñar un catálogo de cepas puras de *Trichoderma spp.*

Hipótesis

Con el desarrollo de un bioproceso para la conservación de cepas nativas de *Trichoderma spp.*, permitirá la conservación del recurso natural fúngico ecuatoriano.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 La crisis de los plaguicidas: un desafío mundial

El ensayo sobre el Principio de la Población (Malthus, 1846) que afirma que la población aumenta exponencialmente mientras los alimentos se producen linealmente alarmó a la comunidad internacional, al igual que la obra de Ehrlich (1968) denominada la *Explosión Demográfica* o la *Bomba P*, que predecía una hambruna masiva a causa del aumento poblacional. A partir de allí los gobiernos implementaron políticas demográficas para frenar el aumento explosivo de la población, dado durante la primera mitad del siglo XX. Además, el auge de la revolución verde, que consistía en la siembra de variedades mejoradas de plantas y el uso de agroquímicos, permitió el aumento de los rendimientos de los cultivos (Sumpsi, 2012). No obstante, polémicas se desataron sobre la pertinencia de emplear agroquímicos para obtener estos resultados, ya que estudios afirmaron que la mala gestión de los agro-insumos afecta negativamente el medio ambiente y la salud de los trabajadores.

Un pesticida o plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga (World Health Organization (WHO) y Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2010), y una plaga es cualquier planta, animal o microorganismo que aumenta su densidad de tal manera que perjudica directa o indirectamente al ser humano; para el caso de la agricultura, la afección se traduce en pérdidas económicas (Brechtel, 2010). El término plaguicida abarca una amplia gama de compuestos como insecticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, molusquicidas, nematocidas, reguladores del crecimiento de las plantas y otros (Aktar et al., 2009). Los pesticidas de mayor impacto son endosulfán, clorpirifós, cipermetrina (Ronco et al., 2008), lambdacialotrina, carbofurano y fipronil (Vieira, Noldin, Deschamps, y Resgalla, 2016). Los plaguicidas constituyen contaminantes persistentes en el agua, el suelo y el aire,

representando un riesgo para los seres vivos no objetivo (Kommanet, 1998). En los animales inducen efectos adversos en las funciones reproductivas e inmunológicas; en plantas provocan disminución de los rendimientos y mayor susceptibilidad a enfermedades; y en el suelo ocasionan pérdida de fertilidad, al resultar mortales para los microorganismos benéficos que participan en los ciclos de carbono y nitrógeno, favoreciendo la absorción de nutrientes por las plantas. Los plaguicidas constituyen contaminantes persistentes, porque pueden encontrarse volatilizados en el aire, la lluvia, las nubes y la neblina (Aktar, Sengupta, y Chowdhury, 2009). Exposición prolongada a estos químicos puede ocasionar en el ser humano trastornos cardiopulmonares, neurológicos y hematológicos, enfermedades de la piel (P L Pingali, Marquez, Palis, y Rola, 1995), alteraciones endocrinas (Campos y Freire, 2016), hiperlipidemia en fetos (Monteagudo et al., 2016), entre otros malestares. Está reportado que muchas de las llamadas “nuevas enfermedades” son generadas por la inadecuada calidad de los alimentos (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2002) y que los factores ambientales son responsables de más del 24 % de la carga mundial de enfermedad y de alrededor del 36 % de las muertes de los niños (Prüss-Üstün y Corvalán, 2005). La alimentación es la fuente de mayor nivel de exposición a residuos de pesticidas para los humanos; se reporta que es alrededor de 10^3 a 10^5 veces mayor que a la exposición en el aire y el agua (Margni, Rossier, Crettaz, y Jolliet, 2002).

Con el paso del tiempo, las plagas se han hecho resistentes a los pesticidas, haciendo necesario el empleo de dosis de más grandes para lograr el mismo efecto, lo que genera mayores costos de producción por concepto de aumento de los requerimientos de agroinsumos y mayor liberación de estos compuestos contaminantes al ambiente (Laxminarayan, 2003). El desequilibrio en el ecosistema de los cultivos agrícolas incide negativamente en la calidad de vida de los agricultores y la salud de los consumidores

(Duarte, 2012). Una forma de cuantificar el impacto de dichos químicos es mediante el método de evaluación del ciclo de vida medioambiental (Margni et al., 2002).

1.2 Situación actual

En vista del disímil crecimiento poblacional y de la producción de los alimentos, así como de la inequitativa distribución de estos últimos, se creó el Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA) en 1994, con el objetivo de reducir la incidencia del hambre y la malnutrición en países en desarrollo (FAO, 2003). Este fue el abrebocas para que en Noviembre de 1996 se realizara en Italia la primera Cumbre Mundial sobre la Alimentación, donde representantes de 185 países y de la Comunidad Europea se reunieron en torno a un tema principal: la erradicación del hambre. Bajo el marco de este evento se firmó la Declaración de Roma sobre la seguridad alimentaria mundial, donde los países se comprometieron a consagrar su voluntad política y a realizar un esfuerzo común y constante para erradicar el hambre de todos los países, con el objetivo inmediato de reducirla a la mitad para el 2015 (FAO, 1996). Estas intenciones se reafirmaron años más tarde durante la Declaración del milenio, donde se establecieron los ocho objetivos del milenio, entre los cuales se destaca la erradicación del hambre y la garantía de la sostenibilidad ambiental (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 2000). En la Cumbre Mundial sobre la Alimentación del año 2009 se reconoció la importancia de la agricultura sostenible como una forma de aumentar la producción sin afectar el medio ambiente, y se manifestó el compromiso de los países para gestionar políticas que permitan a los pequeños agricultores acceder a tecnologías agrícolas sostenibles mediante créditos, subvenciones, capacitaciones, entre otras estrategias. Lo anterior para lograr un mejor aprovechamiento de los recursos naturales, y a la vez se proteja y se conserve el medio ambiente (FAO, 2009a). La agricultura sostenible es la consolidación de tres objetivos principales: la salud ambiental, la rentabilidad económica y la

equidad social. Puede lograrse mediante la aplicación de diversas prácticas agrícolas como la diversificación de los cultivos, la diversidad genética, la gestión integrada de los nutrientes, la gestión integrada de plagas, la gestión sostenible del agua, la tecnología poscosecha y programas de extensión de sonido (Verma, Jaiswal, Meena, Kumar, y Meena, 2015).

A pesar del enorme esfuerzo hecho durante el primer quindenio del siglo XXI, todavía existen 800 millones de personas en situación de desnutrición crónica a nivel mundial (ONU, 2015); sumado a esto, la población mundial ha aumentado el 29 % en los últimos 30 años (Banco Mundial [BM], 2016), mientras el consumo de alimentos por persona, en términos calóricos lo ha hecho el 17 % (Alexandratos y Bruinsma, 2012). Es paradójico que aumente el consumo calórico por persona, pero todavía persista la desnutrición en países en desarrollo, lo que se debe principalmente a la inequitativa distribución de los alimentos. A escala mundial, hay comunidades donde el alimento es insuficiente y provoca estados de desnutrición severa; mientras en otras las dietas son hipercalóricas, conduciendo a su población a la obesidad (van Mil, Foegeding, Windhab, Perrot, y van der Linden, 2014).

Lo anterior evidencia la creciente demanda mundial de alimentos y la necesidad de aumentar productividades de los cultivos para responder a ella, por lo que es fundamental el control de plagas y enfermedades que afectan la productividad de los cultivos (Montealegre y Pérez, 2015). La FAO estima que las pérdidas en producción a causa de diferentes plagas oscila entre el 20 y 40 %, siendo predominantes en Asia, África y Sudamérica, cuyo participación en las pérdidas mundiales es del 43 %, 42 % y 33 % respectivamente (Universidad Nacional Abierta y a Distancia [UNAD], 2001). En los cultivos de arroz las pérdidas pueden llegar hasta el 51 % (Oerke y Dehne, 2004). Sin embargo, la gestión de plagas y enfermedades debe realizarse mediante prácticas de agricultura sostenible, ya que se evidencia una metamorfosis de las exigencias del mercado, donde los consumidores se inclinan cada vez más hacia los productos orgánicos, inocuos y de alta calidad (FAO, 2009b).

En vista del impacto que trae el uso de agroinsumos de origen sintético como pesticidas y fertilizantes, y del grado de concientización de los gobiernos, que se ha visto materializado en declaraciones y acuerdos mundiales, cobran cada vez más importancia los biocontroladores. La implementación de agentes de control biológico en las prácticas agrícolas ha incrementado en los últimos años, principalmente en los países desarrollados; mientras el poco incremento en los países en desarrollo se debe a los productores de orgánicos (Murillo, Rueda, García, y Ruiz Espinoza, 2010). Sin embargo, es necesario implementar estrategias de promoción para la implementación de dichas tecnologías agrícolas sostenibles, ya que todavía gran cantidad de productores agrícolas de países en desarrollo emplean pesticidas y fertilizantes, cuyo carácter tóxico y persistente ya ha sido comprobado en varios estudios. Se reporta que los países en desarrollo consumen el 70 % de los agroquímicos del mundo (Alexandratos y Bruinsma, 2012), y el aumento de consumo es del 5,4 % anual (Oerke y Dehne, 2004), lo cual es alarmante.

Este comportamiento erróneo de los productores agrícolas de países en desarrollo se debe principalmente a: la necesidad de asegurar su supervivencia económica; la ignorancia sobre la insostenibilidad del uso de plaguicidas; la falta de diagnóstico del estado de su salud por exposición a estos químicos, ya que usualmente suele atribuir sus enfermedades a otras causas. Además, muchas variedades de plantas mejoradas están adaptadas al uso de estos químicos para obtener altos rendimientos, por ejemplo las variedades de plantas RR. Lo que desconocen los productores es que el retorno de inversión en tecnologías orgánicas (como el uso de biocontroladores) es constante mientras el de tecnologías convencionales (como el uso de pesticidas) presenta un aumento exponencial inicial del retorno de inversión y luego un declive abrupto, puesto que con el tiempo deteriora la calidad de los recursos naturales y habría que invertir más dinero en su recuperación (Wilson y Tisdell, 2001).

1.3 Situación futura

Se estima que para el año 2050 la población mundial aumentará un 35%, y que la población urbana pasará del 49 % al 70 %; por lo cual la producción mundial de alimentos debe aumentar un 70 % y duplicarse en los países en desarrollo, teniendo en cuenta que cada vez es menos la población rural (Sumpsi, 2012). Además, el consumo de alimentos por persona aumentará un 11 % para 2050 (Alexandratos y Bruinsma, 2012), lo que enfatiza en la necesidad de aumentar la producción agrícola para responder a la demanda mundial de alimentos. Según previsiones de FAO (2009), el 90 % del aumento de la producción para el año 2050 procederá del aumento del rendimiento de los cultivos, mientras el porcentaje restante corresponderá a un aumento de la superficie cultivada, lo que resulta en una disminución de la superficie agraria por habitante en un contexto de escasez de recursos (agua, tierra...) y cambio climático. Retos mundiales como la seguridad alimentaria, los cambios ambientales a nivel mundial y la desnutrición necesitan un enfoque multidisciplinario para abordar los problemas asociados con ellos (Karunasagar y Karunasagar, 2016). Sumpsi (2011) menciona que los progresos para afrontar dichos retos se verán obstaculizados por los impactos del cambio climático en la productividad agraria y el aumento de la utilización de materias primas agrarias como insumos para la producción de biocombustibles. Además, el crecimiento de la productividad será de alrededor del 0,8 % anual, en contraste con el 2,1 % anual reportado durante la primera década del siglo XXI (FAO, 2009; OCDE/FAO, 2013).

Sumado a la necesidad de aumentar los rendimientos en la agricultura y a las restricciones referente a la superficie de cultivo; las nuevas exigencias del mercado en términos de inocuidad y ecología reflejan la necesidad de impulsar e implementar tecnologías sostenibles que permitan aumentar la producción agrícola mediante el aumento de la productividad y el manejo integrado de plagas (MIP) y enfermedades, causantes de muchas pérdidas económicas

a los productores de alimentos. El MIP se enfrenta a retos tanto externos como internos, en el primer grupo se encuentra el aumento de las necesidades para el control de plagas debido al cambio climático, el desarrollo de resistencia de estas plagas a los pesticidas, y la complejidad para diseñar estrategias sostenibles eficaces para su control (Lamichhane et al., 2016).

1.4 La crisis de los plaguicidas: un desafío local

1.4.1 Situación Latinoamericana.

América Latina y el Caribe (ALC) contribuyen al 11 % de la producción mundial de alimentos y poseen el 24 % de las tierras cultivables del mundo (Inter-American Development Bank [IDB], 2016). La tasa de crecimiento anual del sector agrícola en los últimos tres años fue del 2,9 %, superior al crecimiento de la economía (2,6 %); lo que se debió principalmente al crecimiento de la productividad, que correspondió a 2,2 puntos porcentuales del aumento reportado en la producción agrícola (3,2 %), mientras el punto porcentual restante se debió a la expansión de la superficie de cultivo. Dicho Crecimiento fue notorio principalmente en Sudamérica, donde se presentaron elevados volúmenes de cereales y oleaginosas durante 2013-2014, que a diferencia de Centro América presentó condiciones climáticas favorables. En cuanto a comercio internacional, ALC presentó disminución de sus exportaciones agroalimentarias en un 2,5 % mientras sus importaciones lo hicieron un 8 % debido a la fuerte competencia con países africanos y China, que han presentado un ritmo de crecimiento bien acelerado durante los últimos años. ALC es la región que ha presentado más pérdida de dinamismo; seguida de Asia, sin incluir China. (Comisión Económica para América Latina y el Caribe [CEPAL], FAO, y Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2015).

Pese a estos inconvenientes, los países de la región han realizado esfuerzos importantes para incrementar la productividad agrícola y el valor agregado de los productos. El

incremento de la productividad fue posible gracias a la adopción de tecnologías e innovaciones como la utilización de organismos genéticamente modificados (OGM), tecnologías de labranza cero, producción bajo ambientes protegidos, principalmente. También hubo un aumento del grado de concientización de los productores agrícolas sobre el cambio climático y la necesidad de producir utilizando métodos más ecológicos para lograr un crecimiento estable y sostenido del sector. Por tanto, se ha visto un aumento del uso de bioinsumos, que todavía no es generalizado, pero será tendencia durante los años venideros; logrando así responder a una creciente demanda de productos orgánicos y gourmet (CEPAL et al., 2015).

1.4.2 Ecuador.

La agricultura es uno de los ejes principales sobre los que se desenvuelve la economía nacional (Monteros Guerrero, Sumba Lusero, y Salvador Sarauz, 2013), durante la última década ha representado el 8 % del Producto Interno Bruto (PIB) agropecuario con un crecimiento del 4 % al año. Se fundamenta principalmente en la producción de banano, café, cacao, flores y actividades pecuarias; donde más del 50 % es exportable. El valor de las exportaciones agropecuarias cuatriplica el de las importaciones y se ha visto sustentado por el aumento de la productividad en un 6 % durante el 2015 y el de la producción nacional en un 4 % durante 2015 y un 54 % durante los últimos diez años. Este posicionamiento del sector agropecuario en la economía nacional durante el año 2015 ha sido posible gracias a las políticas gubernamentales que permiten un mayor acceso a los agroinsumos y crean un mercado favorable para el productor ecuatoriano. Es necesario resaltar que la contribución promedio de los fertilizantes al costo de producción del agricultor es del 22 % mientras la de los agroquímicos es de tan sólo el 6,7 %. Para el año 2015 se reportó un crecimiento del 7,4 % en el Índice de Precios al Productor (IPP), que incentiva al productor ecuatoriano y garantiza

la sostenibilidad de la producción; disminuciones del 11 % para el Índice de Fertilizantes (IPF) y del 0,3 % para el Índice de Agroquímicos (IPI), teniendo en cuenta que todos los pesticidas tendieron al alza con excepción de los herbicidas (Monteros Guerrero y Salvador Sarauz, 2015).

Los pesticidas empezaron a emplearse durante la segunda mitad del siglo XX, muchos de los cuáles provenían de subvenciones estatales en respuesta a la llamada “Revolución verde” que pretendía aumentar la productividad del agro para poder responder a la creciente demanda mundial de alimentos. Con el tiempo se fueron comprobando los efectos nocivos de estos químicos en el ambiente y la salud de los trabajadores, quienes lo desconocían (Grieshop y Winter, 1989). Un estudio afirma que las principales causales de que se sigan empleando estos químicos pese a que se conozca su impacto negativo en el medio ambiente y la salud son: falta de conocimientos sobre el manejo de pesticidas, tecnología obsoleta y mayor prevalencia dada al ámbito económico sobre la salud humana (Love y Pollanis, 2015).

Actualmente, el Ecuador se encuentra en zona de emergencia, las áreas de producción de maíz, ya que se prevé que los rendimientos caerán hasta en un 60 % durante el año 2016 a causa de enfermedades virales y fúngicas, por lo que habrá que importar el maíz para suplir la demanda nacional (Subsecretaría de Tierras y Reforma Agraria [STRA], 2016). En vista de la necesidad de aumentar la productividad agrícola y de que el Plan Nacional Para el Buen Vivir 2013-2017 plantea como séptimo objetivo nacional “Garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental territorial y global” y como octavo objetivo “Consolidar el sistema económico social y solidario, de forma sostenible” (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo [SENPLADES], 2013), es recomendable la Gestión Integrada de Plagas con agentes biológicos.

1.4.3 Zona 1.

Esta situación ha afectado principalmente a Carchi cuyos cultivos de papa han sido confiados a los pesticidas desde 1960. Entre los principales pesticidas empleados se reportó el uso de fungicidas como ditiocarbamatos de metales e insecticidas como organofosforados y carbofuranos, que se aplicaban sin medidas de protección por diversas razones como la presión social en términos de masculinidad, y limitaciones de calidad, disponibilidad y costo, lo que desencadenaba en cuadros clínicos de toxicidad. Adicionalmente, las prácticas de disposición de desechos contaminaban otros lugares no objetivos. Por tanto, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) realizó a finales de siglo talleres de capacitación a los campesinos; abarcando temas como la dosificación de los pesticidas, las buenas prácticas a la hora de manipular estos químicos y el control biológico, logrando mantener el mismo nivel de producción de papa con la mitad de los gastos en pesticidas y fertilizantes. Posteriormente se realizó la reunión titulada "El impacto de los plaguicidas en la Salud, la Producción y el Medio Ambiente", donde participaron 105 representantes del gobierno, industria, organizaciones de desarrollo, comunidades y medios de comunicación; a partir de allí surgió la "Declaración para la Vida, Medio Ambiente y Producción en Carchi", que reglamenta la formulación de agroquímicos y prohibición de los altamente tóxicos por parte del Servicio Ecuatoriano de Salud Agrícola (SESA), la realización de actividades educativas sobre el uso de pesticidas, la inversión estatal en Gestión Integrada de Cultivos. Sin embargo, la presión de la industria de plaguicidas persuadió a funcionarios del gobierno para retirar el apoyo para la reducción y eventual eliminación de los pesticidas alta y extremadamente tóxicos (Cole, Sherwood, Crissman, Barrera, y Espinosa, 2002; Crissman, Cole, y Carpio, 1994).

A inicios del siglo XXI, pese a que la mayor parte de trabajadores de la Amazonía y de la Sierra Norte ecuatoriana eran conscientes del impacto nocivo de los plaguicidas, se siguieron empleando estos químicos para no perjudicar los rendimientos de los cultivos y asegurar su estabilidad económica, a la vez que continuaban realizando una serie de conductas inadecuadas que ponían en riesgo el medio ambiente y la salud de los trabajadores (Hurtig et al., 2003). Con la financiación del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (IDRC), otros donantes, investigadores y juntas parroquiales se ha logrado con el tiempo encontrar formas de reducir el uso de pesticidas y la exposición de las familias de los agricultores, sin reducir los rendimientos. No obstante, la tasa de intoxicación por plaguicidas en Carchi se encuentra entre las más altas del mundo; pues 4 de cada 100 habitantes sufre intoxicación mientras 4 de cada 10 000 mueren a raíz de estos químicos. Los riesgos se acentúan por el hecho de que los plaguicidas más comunes en esta zona están entre los más peligrosos del mundo, que adicionalmente son los más baratos (Stephen, 2003) y porque las soluciones para fumigar son usualmente preparadas en casa, involucrando a todos los miembros del hogar (Mera-Orcés, 2001). En el año 2006 un estudio demostró que estos químicos son causantes de crecimiento de retraso de los niños del Carchi, así como de anomalías neuroconductuales (Grandjean, Harari, Barr, y Debes, 2006). Adicionalmente, son inhibidores de la coliestereasa, disruptores endocrinos y carcinógenos (Crissman et al., 1994; Srivastava y Singh, 2013).

1.5 Propuesta al desafío: biocontroladores

En vista de las limitaciones anteriormente mencionadas, el aumento de la productividad agraria deberá lograrse mediante la aplicación de tecnologías sostenibles tanto económica como ambientalmente, que permitan responder a la creciente demanda de alimentos y a las exigencias del mercado. Sumpsi (2012) propone cuatro tecnologías sostenibles económica y

ambientalmente, estas son: a) La agricultura de conservación, que se basa en el laboreo mínimo o nulo de la tierra, y la siembra de cultivos asociados o intercalados; b) la agricultura de precisión para el uso eficiente de fertilizantes y del agua de riego; c) la Gestión Integrada de Plagas y enfermedades, que combina el uso de variedades de plantas resistentes y el uso razonable de pesticidas; d) la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad, mediante la mejora genética. No obstante, existen todavía preocupaciones por algunos riesgos hipotéticos de los organismos genéticamente modificados, en lo referente a la salud humana, la nutrición, el medio ambiente natural, la viabilidad económica y el desarrollo rural (Morales Estupiñán, 2001), principalmente en los países en desarrollo. Por su parte, la Gestión Integrada de Plagas (MIP) pretende el crecimiento de cultivos sanos con el menor impacto ambiental, haciendo uso de mecanismos naturales (Duarte, 2012).

Los bioinsumos surgieron como respuesta a la demanda mundial de alimentos trazables, inocuos y ecológicos; ya que sin tener compuestos contaminantes en su fórmula mejoran la productividad, la calidad y la salud de las plantas, o las características biológicas del suelo. Son productos elaborados a partir de microorganismos, los cuales son seleccionados por su capacidad de promover el crecimiento vegetal, directamente al facilitar la absorción de nutrientes por la planta o indirectamente al contribuir al control de enfermedades y plagas. Por tanto, los bioinsumos pueden dividirse en biofertilizantes y biocontroladores, aunque a veces la misma cepa microbiana posee ambas funciones (Nora Altier, Elena Beyhaut, 2012); tal es el caso de *Trichoderma spp.*, que aparte de parasitar hongos patógenos de plantas induce el crecimiento de las plantas y su respuesta inmunitaria tanto localizada como sistémica (Dou et al., 2014).

El biocontrol constituye una estrategia biotecnológica ecológicamente limpia y compatible con la agricultura orgánica y el MIP (Monte y Llobell, 2003). El objetivo de usarlo es crear un equilibrio entre las plagas y los biocontroladores, de modo que la plaga llegue a un nivel

donde ya no sea dañina. Además, el biocontrol presenta amplias ventajas sobre las prácticas convencionales de control de plagas, ya que es económico, no genera resistencia en las plagas, no pone en riesgo la salud de los fumigadores y ni afecta el medio ambiente. No obstante, su uso es completamente preventivo, no retroactivo, ya que actuar cuando la plaga está en pleno auge no trae resultados (Hanke, 2012). Algunos de los productos orgánicos utilizados en el biocontrol de enfermedades se incluyen hongos como *Trichoderma harzianum* y *Gliocadium virens*, actinomicetos como *Streptomyces griseoviridis* y bacterias como *Bacillus subtilis*. (Murillo et al., 2010).

El desarrollo de bioproductos constituye una forma de valorización de la biodiversidad a través de la biotecnología, permitiendo su aprovechamiento económico de forma sostenible con potencial industrial (Quezada, Roca, Szauer, Gómez, y López, 2005; Ramón et al., 2005). Esto constituye una ventaja comparativa para los cinco países miembros de la Comunidad Andina de Naciones (CAN), entre los que se encuentra Ecuador; ya que poseen alrededor del 25 % de la biodiversidad mundial (Manosalvas, Estrella, Mariaca, y Ribadeneira, 2005)

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), firmado en la década de los 90's (incluyendo a la CAN), declara la soberanía de los Estados sobre sus recursos genéticos y establece lineamientos para el acceso y uso de dichos recursos. Para el caso específico del Ecuador, existe el Grupo Nacional de Trabajo sobre Biodiversidad (GNTB), y dentro de él varios subgrupos como el de Bioseguridad y Acceso a Recursos Genéticos (Manosalvas et al., 2005), alineados a la Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030 (Ministerio del Ambiente del Ecuador [MAE], 2015). Se evidencia la importancia de los Bancos de Recursos Genéticos (BRG) con cepas potenciales para uso como bioinsumos, lográndose identificar y conservar las especies para su estudio y/o posterior selección con fines industriales.

1.6 Trichoderma

Se estima que existen alrededor de 1,5 millones de hongos en la naturaleza (Hawksworth, 1991), sin embargo, estimaciones alternativas se han situado entre el medio millón a casi 10 millones (Hawksworth, 2001). Según el Índice Fungorum se han descrito hasta el momento 529 mil especies (Species Fungorum, 2016), lo que demuestra la amplia biodiversidad fúngica y el amplio potencial biotecnológico para el descubrimiento de nuevos metabolitos.

Trichoderma spp., es un género de hongos deuteromicetos pertenecientes a la clase de los Hifomicetos. Se encuentra comúnmente en el suelo, y puede crecer en todos los pisos térmicos, desde los polos hasta los trópicos. Una característica del género es la capacidad para degradar eficazmente una amplia gama de sustratos naturales, (Penttila, Limón, & Nevalainen, 2004), principalmente por su producción de celulasas y hemicelulasas (I. S. Druzhinina & Kubicek, 2016), siendo muy útil en la biotransformación de residuos vegetales para alimentación animal (Valiño, Elías, Torres, Carrasco, & Albelo, 2004). En el sector de la salud, *Trichoderma spp.*, también ha sido un gran aportante, ha mostrado actividad anticancerígena (Saravanakumara et al., 2015) y antitumoral (Li et al., 2011). Según el índice fungorum, se han descrito hasta el momento 296 especies (Species Fungorum, 2016), de las cuales la especie más estudiada es *T. harzianum* (Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991).

Los Centros de Recursos Genéticos (CRG) de hongos permiten aislar, identificar y conservar las especies para aplicaciones específicas en el futuro. La comunidad académica y la industria a menudo requieren más que las cepas, sino también información valiosa con respecto a condiciones de cultivo, conservación y metabolitos producidos. Por tanto, los CRG tienen que ajustarse a los requerimientos de los consumidores (Ryan & Smith, 2004).

Trichoderma spp se considera como uno de los hongos más útiles en la producción de enzimas industriales, la agricultura y la biorremediación (Rey et al., 2004). Las especies de

este género son de gran interés agrícola debido a las características antagónicas que presentan frente a hongos fitopatógenos; para ello ejecutan tres mecanismos de biocontrol: competencia por nutrientes o espacio, antibiosis y micoparasitismo (Bélanger et al., 1995; I. Chet et al., 1997; G. E. Harman & Kubicek, 1998); siendo este último su mecanismo principal de acción (Fernández, 2001). Adicionalmente, está reportado que las celulasas producidas por este hongo son las más eficientes para la degradación de sustratos celulósicos en monómeros de glucosa (Esterbauer et al., 1991). Por lo que se considera a *Trichoderma spp.*, como uno de los hongos más útiles en la producción de enzimas industriales, la agricultura y la biorremediación (Rey et al., 2004).

Los descubrimientos recientes demuestran que son simbioses de plantas, no virulentos oportunistas, así como que son parásitos de otros hongos (G. E. Harman, Howell, Viterbo, Chet, & Lorito, 2004). Varias especies del género se emplean como agentes de control biológico contra hongos patógenos de cultivos agrícolas y como promotores, tanto de la absorción de nutrientes como de la respuesta inmune de las plantas (Bailey et al., 2006). Además, está reportado que semillas pre-germinadas con *Trichoderma spp.*, aumentan su actividad endoquitinasa, y por tanto su resistencia a hongos patógenos (Clavijo & Cotes, 1998; Evans, Holmes, & Thomas, 2003). Por ello, *Trichoderma spp.*, se comercializa usualmente como biofertilizantes y bioplaguicidas (Ilan Chet, 1987; G. E. Harman et al., 2004). Se reporta que más del 60 % de los biofungicidas disponibles en el mercado, son elaborados a partir de este hongo (M. Verma, Brar, Tyagi, Surampalli, & Valéro, 2007).

A pesar de que las especies de *Trichoderma spp.*, han sido evaluadas durante más de 70 años como antagonistas de hongos fitopatógenos, sólo hasta inicios del siglo XXI se empezaron a comercializar como biocontroladores agrícolas; probablemente a causa del cambio de los requerimientos del mercado de los alimentos, que exige cada vez más menor trazas de fungicidas en ellos. Las especies más comunes para este fin son *T. viride* y *T.*

harzianum (Castro & Monte, 2000), que constituyen el ingrediente principal de los bioinsumos comercializados; siendo efectivos contra los hongos *P. nicotianae*, *R. solani*, *Pythium spp.*, *P. aphanidermatum*, *P. parasítica*, *P. capsici*, *R. rolfsii*, entre otros (Stefanova, 2003). Se conoce que aproximadamente el 90 % de los actuales micoplaguicidas para biocontrol de hongos fitopatógenos tiene como principio activo las esporas (conidios y clamidiosporas) de *Trichoderma spp.* (Fernandez-Larrea, 2001; Woo et al., 2006). El tratamiento de las semillas es la forma más extensiva del uso de *Trichoderma spp.*, porque asegura la protección inmediata de la plántula naciente (Marusia, 1997). Harman (Gary Harman, 2000) comparó el desarrollo de varias plantas con y sin aplicación de biocontroladores, demostrando que *Trichoderma spp.*, no sólo protege la planta sino que estimula su crecimiento y absorción de nutriente.

La producción de biopreparados fúngicos para control biológico agentes tiene como objetivo transportan el mayor número posible de propágulos (esporas, para este caso) viables que pueden infectar a los hongos patógenos. Para la formulación de biopesticidas estables las estructuras morfológicas deben permanecer viables durante mucho tiempo antes y después de uso, con un tiempo mínimo de caducidad de 18 meses a 20 ° C (Deshpande, 1999). Su uso contribuye al desarrollo sostenible de la agricultura, permite responder a la demanda orgánica de alimentos y la protege el entorno ecológico de la zona urbana (Marusia, 1997). Sin embargo, uno de las mayores limitaciones del su uso y comercialización es la formulación adecuada de los biopreparados, lo que implica, asegurar su fácil aplicación, bajos costos de producción, concentración suficiente de inóculo, viabilidad de las esporas (Fravel, 2005) y mantenimiento de la densidad de inóculo una vez que aplicado en el suelo o sustrato, tras un periodo de tiempo de medio a largo plazo (Martínez-Medina et al., 2008).

1.6.1 Aislamiento de cepas.

Hongos de este género se han recolectado a partir de los siguientes sustratos: árboles de *Theobroma spp.* (Bailey et al., 2006); muestras de suelo (You et al., 2016); sedimento marino (Ren et al., 2013); rizosferas de aloe (Zhang et al., 2016), de chile, de mango (Guigón-López et al., 2010), de fríjol, de soja (Larralde-Corona et al., 2008); cortezas de mangle (Saravanakumara et al., 2015), de *Taxus baccata* (Adelin et al., 2014); esponjas marinas (Kobayashi, Uehara, Matsunami, Aoki, & Kitagawa, 1993) y mejillones azules (Ruiz et al., 2007).

Para la recolección de las cepas endógenas a partir de plantas que carecen de corteza, como por ejemplo las leguminosas, se deben lavar los tejidos sanos como los tallos, hojas y raíces en trozos pequeños (de 3 cm a 5 cm). Posteriormente, esterilizar con hipoclorito de sodio al 1% durante 4 min a 5 min, luego con tiosulfato de sodio al 2,5% durante 10 min (para eliminar el cloro residual), agua y finalmente con alcohol al 75% durante 1 min. Los tejidos se secan bajo una cámara de flujo laminar, se cortan en trocitos de aproximadamente 0,5 cm y se transfieren a placas de Petri con el medio de cultivo de agar (Wang et al., 2015). Si por el contrario, la recolección se va a hacer a partir de un árbol, se debe retirar un trozo de corteza del tronco a una altura de 1,60-1,70 m, y con un objeto corto punzante cortar astillas triangulares de 0,8 cm x 0,5 cm, como indica la figura 1. El material se lleva al laboratorio, donde se escinde con una cuchilla y con pinzas se toman muestras internas, las cuales se depositan en los medios de cultivo (Evans et al., 2003).



Figura 1. Cortes efectuados en el árbol para la toma de muestras (Evans et al., 2003).

Para recolección de cepas del suelo se suspenden las muestras de suelo en solución salina 0,9 % p/v, luego se toman alícuotas para inocular platos de PDA con antibiótico y se hacen repiques hasta obtener la cepa pura en medios sin antibiótico (Larralde-Corona et al., 2008). Otros autores reportan para la suspensión de las muestras de suelo sólo agua destilada estéril en proporción de 1/1000 (Sánchez López, Martínez Bolaños, Zavala González, & Ramírez Lepe, 2012).

En la Tabla 1 se mencionan los principales medios de cultivo reportados en la literatura para el aislamiento del *Trichoderma spp.*

Tabla 1. Medios de cultivos reportados para el aislamiento de *Trichoderma spp.*

Medio	Suplemento	Referencia
Agar Peptona Dextrosa	Rosa bengala y estreptomicina	(Martin, 1950)
Agar Papa Dextrosa	Penicilina y estreptomicina	(Evans et al., 2003)
Agar Extracto de Malta	Cloranfenicol	(Evans et al., 2003)
Agar Papa Dextrosa	Cloranfenicol	(Wang et al., 2015)
Medio selectivo	Cloranfenicol	(Sánchez López et al., 2012)

Se reportan tiempos de incubación de una semana a 25 °C (Martin, 1950), ocho semanas a 25 °C (Evans et al., 2003) y cuatro días a 28 °C en condiciones de oscuridad (Zhang et al., 2016). Luego, las cepas se purifican en Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (Thongram, Sarangthem, Gourshyam, & Bharat, 2013), medio Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (YPD, por sus siglas en inglés) (Larralde-Corona et al., 2008) o Agar Zanahoria Papa a 25 °C en condiciones de oscuridad (CPA, por sus siglas en inglés) (Evans et al., 2003) durante 20 días (Lang et al., 2015) y se hacen repiques cuantas veces sea necesario hasta obtener cepas puras.

1.6.2 Identificación de especies.

Las colonias de hongos pertenecientes al género *Trichoderma spp.*, se reconocen fácilmente por su rápido crecimiento y su coloración, que varía del blanco-verde a amarillo-verdoso. En el área de conidiosporas se observan anillos concéntricos, y por el revés de la colonia puede haber coloración amarillo, ámbar, amarillo verdoso o neutro. En cuanto a características microscópicas, los conidióforos son por lo general hialinos, erectos, ramificados, no verticilados, solitarios o en grupos, con fiálides hialinos en forma de botella. Las conidiosporas están dispuestas en el ápice de las fiálides; su morfología puede variar de subglobosa a oblonga, lisa a espinosa, hialina a verde, dependiendo de la especie (Arango, Ordoñez, Castañeda, & Restrepo, 1988; Barnett & Hunter, 1972).

La identificación de cepas a nivel de especie es el primer paso para el aprovechamiento potencial de *Trichoderma spp.*, iniciando con la caracterización, que da a conocer las aplicaciones específicas del hongo de acuerdo con los metabolitos producidos (Lieckfeldt, Samuels, Nirenberg, & Petrini, 1999). La identificación de especies se realizaba inicialmente por patrones de ramificación y morfología tanto de conidios como de conidióforos (Rifai, 1969) mediante observación al microscopio luego de 6-7 días de crecimiento del hongo en PDA a 25-30° C (Thongram et al., 2013). Bissett (1984, 1991), Barnett y Hunter (1978) establecieron claves taxonómicas para diferenciar las especies del género. Sin embargo, existen pocos caracteres morfológicos útiles, y los que hay son similares, por lo que la identificación de especies precisa basada en la morfología es difícil (Respinis et al., 2010).

Frente a este inconveniente, cada vez va tomando mayor utilidad las técnicas y herramientas de identificación molecular (C. Kubicek, Komon-Zelazowska, & Druzhinina, 2008). Para la extracción del ADN se inocula Caldo de Papa Dextrosa (PDB, por sus siglas en inglés) con tacos de PDA colonizados con micelio aéreo de *Trichoderma spp.*, se incuba durante 48 h a 24 °C en un agitador orbital, se filtra en un embudo Buchner, se lava el micelio con agua estéril y se muele; finalmente se procesa según el tipo de técnica molecular escogida

(Thongram et al., 2013). Algunas de ellas son: código de barras de oligonucleótidos (I. Druzhinina et al., 2005), análisis en software (MEGA5) versión 5 (Tamura et al., 2011), toma de huellas dactilares de ADN, Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), amplificación y secuenciación del Espaciador Transcrito Interno (ITS, por sus siglas en inglés) (Gams & Bissett, 1998; Lieckfeldt, Kuhls, & Muthumeenakshi, 1998).

Actualmente se han secuenciado los siguientes genomas de *Trichoderma* spp.: *T. reesei*, *T. virens*, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. parareesei*, *T. gamsii*, *T. longibrachiatum* y *T. citrinoviride* (Baroncelli, Zapparata, Piaggese, Sarrocco, & Vannacci, 2016; C. P. Kubicek et al., 2011; Martinez et al., 2008; Mukherjee, Horwitz, Herrera-Estrella, Schmoll, & Kenerley, 2013; Yang et al., 2015). En la figura 2. Se nota la variabilidad en la morfología del micelio, de acuerdo con el tipo de cepa empleada, algo común es que esporulan de color verde.

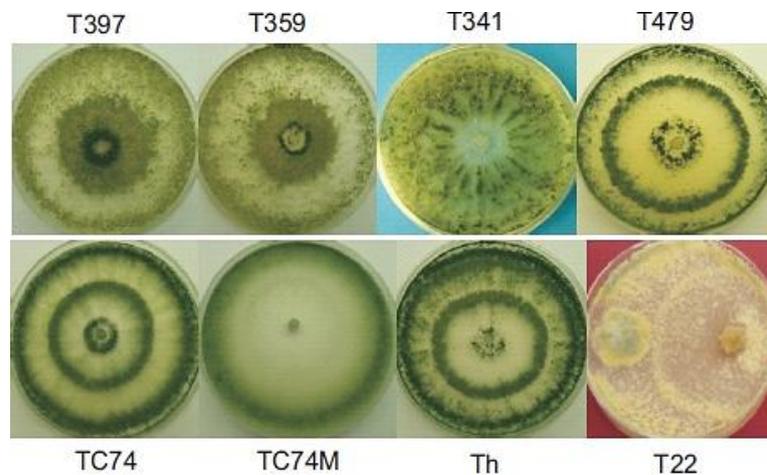


Figura 2. Crecimiento de colonias de diferentes cepas de *Trichoderma* spp. (Guigón-López et al., 2010).

1.7 Caracterización

1.7.1 Tasas de crecimiento

Se toman plugs o tacos de PDA con micelio y se inoculan cajas de Petri con PDA, las cuales se incuban a 25 °C durante el tiempo necesario para que el micelio recubra completamente la superficie de la caja. El crecimiento radial se mide diariamente y la Tasa de Crecimiento radial (TC) se calcula como sigue: $TC = (\text{Crecimiento final} - \text{Crecimiento inicial}) / \text{tiempo de incubación}$ (Larralde-Corona et al., 2008).

Uno de los medios de cultivo utilizados para la reproducción de *Trichoderma spp.*, y determinar la velocidad de crecimiento es agar papa destroza (Asran-Amal, Moustafa-Mahmoud, Sabet, & El Banna, 2010; Guigón-lópez et al., 2010), incuban a 25° C (Correa et al., 2007); (Dou et al., 2014), durante tres a cinco días (Torres De La Cruz et al., 2015); Al Hazmi & TariqJaveed, (2016) mencionan que *Trichoderma* se cultivó en PDA e incubo a 24° C durante 14 días; Agamez, Zapata, Oviedo, & Barrera, (2008) indican que *Trihoderma sp.*, se incuba durante siete días a una temperatura de 25 – 28° C; *Trichoderma asperellum* desarrolla una mayor tasa de crecimiento *in vitro* (Guigón-lópez et al., 2010), de acuerdo a Sandoval & Noelting (2011) el medio semisólido estimula la producción de conidios en mayor medida que el medio líquido; Marcello et al., (2010) cultivó *T. asperellum* en medio MYG que contenía 0,5% de extracto de malta, 0,25% de extracto de levadura, 1% de glucosa y 2% de agar; es recomendable sembrar *Trichoderma sp.*, en agar rosa de bengala (Cubillos et al., 2014), *T. asperellum* crece mejor a 25° (Guigón & González, 2004).

Reyes Ramírez, Alejo, Ruiz Sánchez, María, & Suárez, (2012) registraron el crecimiento radial mediante la medición lineal de la distancia de crecimiento del hongo a partir del punto de inoculación; la incubación de *Trichoderma sp.*, bajo luz blanca favorece la esporulación (E. Agamez et al., 2008); Las colonias de la cepa *Trichoderma inhamatum* BOL-12QD crecen y maduran a los 7 días de incubación en PDA a 30 °C (C. García, Mamani, Chávez, & Álvarez, 2016).

1.7.2 Producción de metabolitos

La biosíntesis de metabolitos secundarios en los hongos a menudo implica vías bioquímicas únicas e inusuales, que si se varían sutilmente, pueden originar diversidad de sustancias a partir de sólo unos precursores clave, provenientes del metabolismo primario como ácidos acetyl-CoA reductasa, mevalonato y aminoácidos (Demain & Fang, 2000; Keller, Turner, & Bennett, 2005). Dentro de los metabolitos secundarios derivados de *Trichoderma spp.*, se destacan: péptidos no ribosomales como peptaibioles, sideróforos, micotoxinas, policétidos, terpenos, pironas, entre otros. Sin embargo, la producción de estas sustancias depende de la especie y de la cepa con que se esté trabajando, y no meramente de las condiciones de cultivo, aunque el uso de inductores puede ser necesario (Zeilinger, Gruber, Bansal, & Mukherjee, 2016). En la tabla 2 se consignan algunos de los metabolitos producidos por este género.

Tabla 2. Metabolitos producidos por las especies de *Trichoderma spp.*

Tipo	Metabolito	Especie	Referencia	
Enzima	Celobiohidrolasas	<i>T. viride</i>	(Valiño et al., 2004)	
	Betaglucanasa	<i>T. ovalisporum</i>	(Bailey et al., 2006)	
	Celulasa	<i>T. ovalisporum</i>	(Bailey et al., 2006)	
	Poligalacturonasa	<i>T. ovalisporum</i>	(Bailey et al., 2006)	
	Proteasa	<i>T. ovalisporum</i>	(Bailey et al., 2006)	
		<i>T. harzianum</i>	(Suárez et al., 2005)	
		<i>T. reesei</i>	(Grinyer et al., 2007)	
	Xilanasa	<i>T. harzianum</i>	(Tseng, Liu, Yang, Lo, & Peng, 2008)	
		β -1,3-glucanasa	<i>T. harzianum</i>	(Tseng et al., 2008)
		β -1,6-glucanasa	<i>T. harzianum</i>	(Tseng et al., 2008)
Cetoacil sintasa	<i>T. harzianum</i>	(Yao et al., 2016)		

Tipo	Metabolito	Especie	Referencia
	β -1,4-mananasa	<i>T. virens</i>	(Chai, Abu Bakar, Mahadi, & Murad, 2016)
	Acetil-estereasa	<i>T. reesei</i>	(Kremnický, Mastihuba, & Côté, 2004)
Antraquinona	Crisofanol	<i>T. harzianum</i>	(Liu et al., 2016)
Péptido	Peptaibiol	<i>T. isocyanide</i>	(Ren et al., 2013)
bioactivo		<i>T. longibrachiatum</i>	(Ruiz et al., 2007)
	Tricorvina	<i>T. viride</i>	(Wada, Iida, Asami, & Fujita, 1996)
	Poliporinas	<i>T. polysporum</i>	(New et al., 1996)
Antibiótico	Homothallin II	<i>T. harzianum</i>	(Faull, Graeme-Cook, & Pilkington, 1994)
Ácido orgánico	A. propiónico	<i>T. hamatum</i>	(Baldwin et al., 1985)
Policétido	Koningininos	<i>T. koningii</i>	(Lang et al., 2015)
	Trichoharzin	<i>T. harzianum</i>	(Kobayashi et al., 1993)
Terpeno	Harzian tetracíclico	<i>T. atroviridae</i>	(Adelin et al., 2014)
	Citrinovirina	<i>T. citrinoviride</i>	(Liang, Miao, Song, Liu, & Ji, 2016)
Sesquiterpeno	Pestalotiopsina	<i>Trichoderma spp.</i>	(Yu et al., 2015)
Micotoxina	Citocalasina	<i>T. gamsii</i>	(L. Chen et al., 2014)
Alcohol	Etanol	<i>T. harzianum</i>	(Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991)

1.7.3 Efecto antagónico

El mecanismo de acción de *Trichoderma spp.* como biocontrolador se basa en la hidrólisis de la pared celular del patógeno, debido principalmente a las enzimas hidrolíticas exoquitinasas y β -1-3 glucanasas que produce extracelularmente; lo que resulta mortal para el

patógeno, ya que la pared celular de los hongos se compone de un 80 % de quitina (Clavijo & Cotes, 1998).

Para medir el efecto antagónico de *Trichoderma spp.* otros microorganismos se utiliza el método de cultivos duales (Larralde-Corona et al., 2008), mediante confrontación de las dos cepas en cajas de Petri con PDA, con una separación inicial de 5 cm aproximadamente, bajo unas condiciones de cultivo de 20-25 °C durante 120 h con un fotoperiodo 12:12 (luz:oscuridad). El porcentaje de Inhibición del Crecimiento (IC) de los patógenos se calcula contrastando su tasa de crecimiento en ausencia y en presencia de *Trichoderma spp.* en el medio de cultivo, siendo considerada como el 100 % a la tasa de crecimiento del patógeno en el cultivo axénico (Guigón-López et al., 2010). En la tabla 3 se listan algunos de los patógenos inhibidos por *Trichoderma spp.*

Tabla 3. Fitopatógenos objetivo del Biocontrolador *Trichoderma spp.*

Fitopatógeno	Biocontrolador	Referencia
Rhizoctonia solani	<i>T. koningii</i>	(Clavijo & Cotes, 1998)
	<i>T. harzianum</i>	(Tseng et al., 2008)
Fusarium oxysporum	<i>T. koningii</i>	(Clavijo & Cotes, 1998)
Pythium splendens	<i>T. koningii</i>	(Clavijo & Cotes, 1998)
Moniliophthora roreri	<i>T. ovalisporum</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. harzianum</i>	(Bailey et al., 2006)
Crinipellis roreri	<i>T. ovalisporum</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. harzianum</i>	(Bailey et al., 2006; Evans et al., 2003)
Botrytis cinerea	<i>T. harzianum</i>	(Liu et al., 2016)
Staphylococcus aureus	<i>T. citrinoviride</i>	(Liang et al., 2016)
Sclerotinia sclerotiorum	<i>T. harzianum</i>	(Zhang et al., 2016)
Staphylococcus aureus	<i>T. citrinoviride</i>	(Liang et al., 2016)
Aspergillus niger	<i>T. harzianum</i>	(Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991)

Fitopatígeno	Biocontrolador	Referencia
Escherichia coli	<i>T. koningii</i>	(Ghisalberti & Sivasithamparam, 1991)

1.8 Conservación de cepas

El objetivo de la preservación es para mantener la pureza, la viabilidad, la capacidad de esporulación y la integridad genómica de la cepa (Smith & Ryan, 2004). El mantenimiento de la integridad fenotípica y genómica de la cepa es de suma importancia, y puede verse afectada por malas técnicas de preservación (Ryan & Smith, 2004). Kuhls, Lieckfeldt y Börner (1995) notaron que cepas presumiblemente idénticas de *Trichoderma spp* obtenidas de diferentes CRG tenían desviaciones en las huellas dactilares por PCR. Un científico con poca experiencia puede inadvertidamente trabajar con una cepa degenerada, producir resultados falsos y sacar conclusiones erróneas (Ryan & Smith, 2004). Fuentes no fiables de recursos genéticos fúngicos pueden provocar resultados desastrosos en términos económicos, ya que la cepa puede no ser estable genéticamente o puede estar mal identificada, ocasionando que seguramente no manifieste los resultados esperados tanto en velocidad de crecimiento, como de tipo y cantidad de metabolitos producidos. La necesidad de asegurar la estabilidad de las cepas para aplicaciones biotecnológicas es de suma importancia (Clutterbuck, 2004). Por tanto, los métodos de preservación empleados deben ser reproducibles y garantizar la integridad fenotípica y genómica de las cepas, o por lo menos minimizar su deterioro (Ryan & Smith, 2004).

Se reportan métodos de almacenamiento en glicerol 35 % v/v a -70 °C (Larralde-Corona et al., 2008), Agar Harina de Maíz (CMA, por sus siglas en inglés) a 5 °C (Sánchez López et al., 2012), inmersión en aceite mineral o agua destilada estéril (Gato, Rodríguez, & Elósegui, 2009), subcultivo continuo (repique), congelación y liofilización (Ryan, Smith, & Jeffries,

2000). No obstante, el método de liofilización es el más adecuado para hongos formadores de esporas ya que es difícil la revitalización de las hifas después de la conservación. Aunque se pueden añadir lioprotectores como suero, leche desnatada, inositol, glicerol, trehalosa y peptona al medio de suspensión para reducir los daños (Ryan & Smith, 2004). Se recomienda que si la cepa es para uso industrial se empleen los métodos de conservación a largo plazo, como liofilización y criopreservación en nitrógeno líquido de -140 a -196 °C, ya que preservan la estabilidad genética de la cepa, de lo contrario se empleen los métodos alternativos. Sin embargo, estos dos métodos óptimos no se pueden implementar en laboratorios con recursos limitados (Gato, 2010; Ryan et al., 2000).

Las cepas de *Trichoderma* se conservan por liofilización (Bettiol, Rivera, Mondino, Montealegre, & Colmenárez, 2014), los mejores resultados para la conservación de cepas se han obtenido con la liofilización (Godínez, 2008), ha sido utilizada tanto para preservación de levaduras y hongos filamentosos (Manuel, Andreu, Machín, & Perurena, 2005). Las esporas producidas bajo condiciones controladas de luz y temperatura presentan mayor resistencia a la liofilización (Ortiz et al., 1995). La liofilización es un método efectivo para la preservación de una amplia variedad de bacterias y bacteriófagos, favorece el mantenimiento de la viabilidad por más de 50 años (Instituto de Biotecnología, 2016).

1.9 Producción de biopreparados

Existen cuatro formas fundamentales de producción: cultivos bifásicos, fermentación en estado sólido, fermentación líquida estática y líquida agitada (Elósegui, 2006). Por lo general para la reproducción masiva de las cepas promisorias de *Trichoderma spp.* se utilizan métodos bifásicos, líquido-líquido y líquido-sólido (Stefanova, 2003). La bifásica es la más rápida, porque se produce el inóculo por fermentación líquida; que luego se usa para fermentar el sustrato sólido (R. García, 2006); además, está reportado que en medio líquido se

producen sustancias promotoras del crecimiento de la planta como ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas y vitaminas (Wei, Liang, Zhang, & Luo, 2006). A continuación se exponen las principales formas de producción.

1.9.1 Producción por Fermentación en Estado Sólido

Sustratos: la elección de los sustratos depende de su costo, la disponibilidad local y de los requerimientos nutricionales de la cepa (Elósegui, 2006). Por lo general se emplea el grano entero de arroz, pero tiene un costo relativamente alto en comparación con varios residuos agroindustriales (Fernandez-Larrea, 2004). Por ende, se han evaluado otros sustratos como cáscaras de tomate, cascarilla de arroz, cáscara de ajo, cáscara de cacao, cáscara de ajonjolí, cáscara de cacahuate, cáscara de café, vaina de frijol, rastrojo de soya y maíz, olote de maíz, y granos de arroz, de sorgo, de alpiste y de maíz quebrado (Michel-Aceves et al., 2008), paja de arroz, paja de trigo (Fernández, 2001), estiércol de granja, pseudotallo de plátano, hojas de plátano secas (Thangavelu, Palaniswami, & Velazhahan, 2004), entre otros. Las hojas de banano enriquecidas con azúcar morena en solución a ebullición presentan la más alta producción de esporas de *Trichoderma spp* (4.6×10^{32} UFC/g material) (Thangavelu et al., 2004).

Preparación de inóculos: se re-activan las cepas en Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) durante siete días a una temperatura de 25-28 °C, o hasta que el micelio esporule. Luego, para pruebas de germinación, se deposita un cubito de agar colonizado (0,5 cm diámetro) en 10 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,1% y se homogeniza en un agitador vibratorio durante 30 segundos; se realizan diluciones seriadas decimales con la adición de Tween 80 al 0,1% hasta obtener la dilución apropiada (10^{-3}) y se contabiliza en número de conidios en cámara de Newbauer (Fernández-Larrea, 1997) o en un hemocitómetro con un microscopio de contraste de fase (Ahamed & Vermette, 2008). También se reportan

inóculos sobre sustratos sólidos como avena, vermiculita y bentonita, homogenizados con agua (Martínez-Medina et al., 2008).

Preparación de las materias primas: algunas materias primas deben sufrir un proceso de reducción de tamaño hasta obtener un tamaño de partícula de 0,5-3,0 mm (E. Y. Agamez, Zapata, Oviedo, & Barrera, 2008). El sustrato molido o entero, dependiendo del caso, se lava para retirar impurezas y se hidrata por inmersión en agua con antibiótico cloranfenicol a 500 ppm durante 45 minutos. Luego se filtra y se deposita en la bolsa de poliestireno la cantidad de sustrato apropiada para llenar en sólo una tercera parte de su volumen (Michel-Aceves, Reyes-De la Cruz, Otero-Sánchez, Rebolledo-Domínguez, & Lezama-Gutiérrez, 2005). Luego se esteriliza en autoclave durante 30 minutos a una presión de 103 421 Pascales (Michel-Aceves et al., 2005), aunque también se reportan condiciones de esterilización de 115 °C a 5 171 Pa durante 15 min (E. Y. Agamez et al., 2008) y de 120 °C por 30 minutos (Leal, Romero-Arenas, Rivera, & Huerta, 2015). Algunos autores mencionan que los sustratos se pueden enriquecer con melaza y urea, las cuáles se disuelven en el agua de inmersión durante la hidratación de la materia prima por 2 horas (E. Y. Agamez et al., 2008).

Inoculación e incubación: el sustrato estéril se enfría e inocular con un cubo de agar colonizado y se incuba durante 21 días a 25 °C con suministro de aire cada cinco días (Michel-Aceves et al., 2008). También se reportan 26 a 28 °C durante 8 días (E. Y. Agamez et al., 2008).

Formulación: formular un bioinsumo de origen fúngico consiste en adicionarle al hongo determinados compuestos como agentes humectantes, dispersantes, reguladores de la viscosidad, protectores de luz UV, atrayentes, tensoactivos, solventes, emulsificantes o gelificantes, y otros aditivos que pueden ser nutrientes o estimulantes, para favorecer la estabilidad del producto, la longevidad del hongo, mejorar su desempeño como biocontrolador y facilitar su aplicación (Gato, 2010). Existen aditivos dañinos a corto o

mediano plazo con la pared celular de las esporas, haciéndolas inviables en pocas semanas; tal es el caso de los aceites vegetales (Jenkins & Grzywacz, 2003; Sanyang, Van Emden, & Moore, 2000).

Almacenamiento: el bioinsumo debe ser estable durante 6 a 18 meses bajo condiciones normales de almacenamiento, para que resulte factible la comercialización (Caraballo, 1998). La biodegradabilidad del producto está muy influenciada por la humedad y la temperatura, por lo que la tecnología de empaqueo es esencial para garantizar una humedad relativa baja a una temperatura de almacenamiento menor de 20 °C. Lo óptimo es almacenar los productos a humedades relativas menores del 1% y temperaturas de refrigeración de 5 °C; sin embargo no es económicamente viable (Elósegui, 2006; Jenkins & Grzywacz, 2003).

Rendimiento: el hongo *Trichoderma* sp, produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidiosporas (Papavizas, 1985); siendo estos últimos los más estables (Elad, Zimand, Aviv, & Chet, 1993) gracias a su gruesa pared tricapa que les permite sobrevivir a condiciones adversas hasta que encuentren las propicias para germinar (Elad & Kirshner, 1993). Debido a esto, la viabilidad se mide como la germinación de esporas (conidios) en el sustrato. El maíz triturado (Leal et al., 2015) y el olote de maíz presentan un 99,0 % de viabilidad, seguidos por el grano de arroz con 97,5 %, la cascarilla de arroz con 97,0 % y la cáscara de ajonjolí con 95,5 % (Michel-Aceves et al., 2008). En la tabla 1 se listan algunos de los medios empleados y la correspondiente producción de esporas en ellos.

Tabla 4. Sustratos empleados para la producción de esporas de *Trichoderma* spp.

Sustrato	Suplemento	Producción de esporas (10 ⁸ ml ⁻¹)	Referencia
Olote de maíz		4,43	(Michel-Aceves et al., 2008)
Grano de arroz		3,13	(Michel-Aceves et al.,

Sustrato	Suplemento	Producción de esporas (10 ⁸ ml ⁻¹)	Referencia
			2008)
Cascarilla de arroz		1,47	(Michel-Aceves et al., 2008)
Cáscara de ajonjolí		1,11	(Michel-Aceves et al., 2008)
Cascarilla de algodón	Melaza, urea	2,10	(E. Y. Agamez et al., 2008)
Semillas del árbol del pan (<i>Artocarpus incisa</i>)	Melaza, urea	8,38	(E. Y. Agamez et al., 2008)

1.9.2 Producción por Fermentación Líquida:

Producción del inóculo: reactivar las cepas en PDA e incubar a 27 °C durante tres a cinco días, luego adicionar 10 mL de agua destilada estéril, agitar un poco, remover la suspensión de esporas en un frasco y conservar (R. García, 2006).

Preparación del medio de cultivo: preparar una solución acuosa de melaza al 5 %, ajustar a pH 5,5 y vertir en frascos de vidrio, llenando sólo el 40 % de su volumen. Esterilizar la solución en autoclave a 121 °C y 5 171 Pa durante 20 min, dejar reposar por 24 h y añadir 5% de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Finalmente, adicionar aproximadamente 5 mL de inóculo por frasco, tapar con algodón y papel aluminio, e incubar en forma estática inclinada durante 14 días (R. García, 2006). También se reporta a mayor escala medios de cultivo “base” constituidos por glucosa, sulfato de amonio y sales minerales (Flores, Hassan, Corkidi, Galindo, & Serrano-Carreón, 2003); orujo de uva agotado al 4 %, suplementado con urea y H₃PO₄ (Vaccarino, Lo Curto, Tripodo, Patané, & Ragno, 1992). Medios con celulosa, extracto de levadura, lactosa y ácido lactobiónico promueven la producción de celulasas (Ahamed & Vermette, 2008).

Rendimientos: con bioreactores alimentados se van suministrando los nutrientes de acuerdo a los requerimientos del hongo, mientras que con bioreactores batch se suministra por única vez un medio de cultivo rico y la fermentación termina cuando este se agote. Los bioreactores alimentados presentan una producción de biomasa 3,6 veces mayor que los batch (Flores et al., 2003).

1.9.3 Parámetros de control

Fuente de Carbono: este hongo degrada polímeros de carbono muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros, gracias al complejo de enzimas hidrolíticas que produce (Moore-Landecker, 1996). Si se emplean sustratos muy rígidos como aserrín se retarda el crecimiento del hongo; pero si por el contrario se emplean sustratos fácilmente degradables como lactosa o celobiosa, se inhibe su actividad celulasa (Esterbauer et al., 1991).

Fuente de Nitrógeno: puede asimilar compuestos nitrogenados como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (Moore-Landecker, 1996). Sin embargo, un exceso en la concentración de nitrógeno causa inhibición del crecimiento del hongo (Flores et al., 2003).

Relación Carbono-Nitrógeno: la fuente Carbono debe estar en exceso en el medio de cultivo mientras el contenido de Nitrógeno sea limitado, lo que inhibe el crecimiento micelial y desencadena el proceso esporulativo (Elósegui, 2006).

Microelementos: los minerales, sales y vitaminas no son indispensables en grandes cantidades para el desarrollo del hongo (Papavizas, 1985) porque pasan de ser inductores a tóxicos (Somashekar, Kulashekar, & Prabhu, 1983); sólo se requieren trazas de hierro, cobre, zinc, manganeso y molibdeno en concentraciones cercanas a 1×10^{-9} M. Adicionalmente son necesarias las siguientes vitaminas: tiamina (B6), piridoxina (B6), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), riboflavina (B2), cianocobalina (B12) y ácido aminobenzoico (Moore-Landecker, 1996). Se reportan que concentraciones de 1 a 10 mmol/L de Cd^{2+}

generan cambios morfológicos y desaceleración de la tasa de crecimiento del hongo; mientras concentraciones de 1 a 5 mmol/L de Hg^{2+} generan sólo inhibición del crecimiento más mutaciones (Frank, Tánová, & Takácsová, 1993).

Humedad: *Trichoderma spp.* presenta bajo nivel de tolerancia osmótica (Kredics et al., 2003). Un exceso de humedad baja la disponibilidad de oxígeno, limitando desarrollo del hongo, y compacta el sustrato impidiendo su colonización total. Por otro lado, una baja humedad inhibe el desarrollo del hongo al no permitir la movilidad de nutrientes en solución y secar el micelio (Elósegui, 2006). El hongo puede crecer en un rango de humedad del medio del 30 al 75 % (Pérez-Guerra, Torrado-Agrasar, López-Macias, & Pastrana, 2003), aunque algunos autores recomiendan una humedad del 70-80 % (E. Y. Agamez et al., 2008).

Temperatura: se han efectuado varios estudios para evaluar la influencia de la temperatura en el desarrollo de la biomasa fúngica; encontrándose que *Trichoderma spp.*, puede desarrollarse en un rango de temperatura de 10-40 °C, fuera de este rango puede ocurrir desnaturalización de proteínas, inhibición de enzimas, supresión o promoción de metabolitos, pérdida de viabilidad y muerte celular. Por otro lado, la temperatura óptima de crecimiento depende de la especie, que por lo general se ubica en un rango más estrecho, de 15-30 °C. (Kredics et al., 2003; Nampoothiri et al., 2004), y la temperatura óptima de producción de celulasas está entre 25-28 °C (Esterbauer et al., 1991).

pH: es un parámetro crítico en la viabilidad del hongo (Flores et al., 2003). La mayoría de las especies del género pueden crecer en un amplio rango de pH de 2,0-6,0, con un óptimo de 4; aunque algunos autores sugieren un rango de 4,6 a 6,8 para el crecimiento de la biomasa. Para producción de enzimas los óptimos son pH=5,0 para β -glucosidasa y celobiohidrolasa; pH=3,0 para β -xilosidasa; y pH=6,0-7,0 para proteasas (Jackson, Whipps, & Lynch, 1991; Kredics et al., 2003). El pH se puede ajustar con ácido acético 10% o con NaOH 2 N durante

la hidratación del sustrato para fermentación sólida o en la preparación del medio líquido para fermentación sumergida (Flores et al., 2003; Michel-Aceves et al., 2008).

Aire: la aireación ocasional permite un buen crecimiento y esporulación del hongo (Michel-Aceves et al., 2008), ya que concentraciones de dióxido de carbono en el aire superiores al 10-15 %, producto de la respiración celular, inhiben el crecimiento (Moore-Landecker, 1996). Para fermentación líquida se recomiendan impulsores grandes, que permiten una mejor transferencia de oxígeno (Flores et al., 2003).

Empaque: La forma de presentación de los Bioproductos puede variar. Para efectos de facilidad de manipulación se prefiere la presentación sólida, principalmente: polvos humedecibles, polvos secos, formulaciones en aceite y encapsulados que contienen esporas del hongo. Sin embargo, la presentación líquida representa una alternativa para cuando la demanda es alta, ya que la producción es masiva y más rápida (R. García, 2006).

Bioreactores: escala semi-industrial se reportan bioceldas de poliestireno de 25x34 cm (Michel-Aceves et al., 2008) y bandejas plásticas rectangulares de 30 x 15 cm (Fernández-Larrea, 1997). Agamez y colaboradores (2008) modificaron estas bandejas con orificios de 2 cm de diámetro, ubicados en la parte superior de un lado de la bandeja. En estos orificios introdujeron tubos de PVC de 5,0 cm de longitud acondicionados con algodón y gasa humedecida con alcohol al 95%. A escala industrial se reportan bioreactores de 14 L equipados con turbinas Rushton (Flores et al., 2003), bioreactores de 16 L .

1.10 Catálogo de cepas

El catalogo de cepas nativas de *Trichoderma asperellum* es una herramienta que brinda a estudiantes e investigadores un fácil manejo de las cepas, puesto que proporciona información específica para el uso de las cepas nativas, es importante que se establezcan protocolos para la conservación de la biodiversidad fúngica nativa ecuatoriana ya que se ve amenazada por el

ingreso de productos biológicos exóticos, es de gran importancia que el estado establezcan un banco de recursos genéticos nativos que garantice el uso sustentable y su conservación. Actualmente en el Centro de Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) se ha logrado aislar, identificar, caracterizar y conservar una cepa nativa de *Trichoderma asperellum* de código CEBA-IIE-TA-010116, con el apoyo de la Universidad Técnica del Norte y la empresa privada El Ingenio Azucarero del Norte (IANCEN).

Es recomendable seguir estándares de calidad para garantizar la viabilidad, pureza y autenticidad de las cepas que se conserven, dichos estándares deben ser establecidos en el catálogo de cepas microbianas (Centro Español de Cultivos Tipo, 2017; ICIDCA, 2003).

2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

2.1 Aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa de *Trichoderma spp.*

Este experimento tiene como objetivo realizar el aislamiento, identificación y caracterización de la cepa nativa de *Trichoderma spp.*

2.1.1 Materiales y métodos

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología Fúngica del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) con el apoyo del Ingenio Azucarero del Norte (IANCEN).

Ubicación

Las muestras de suelo que se utilizaron para realizar el aislamiento de *Trichoderma spp.*, fueron recolectadas en la Provincia de Imbabura, Cantón Ibarra, Parroquia Ambuquí, Sector Canteros de cultivo de caña de azúcar pertenecientes al Ingenio Azucarero del Norte – IANCEN en las siguientes coordenadas geográficas UTM WGS84 ZONA 17S:

ESTE 823536,76 NORTE 10052977,02



Figura 3. Área de recolección de muestras de suelo.

Aislamiento

Para la recolección de muestras de suelo se utilizaron los siguientes materiales y equipos:

- GPS Modelo Trimble Juno
- Cámara fotográfica Modelo MotoE XT1506
- 20 Cajas petri plásticas estériles.
- Libreta de campo.
- Marcador de tinta permanente
- Guantes desechables
- Fundas plásticas
- Masquen
- Pala de jardín

Para el aislamiento de las cepas se utilizaron los siguientes materiales y equipos:

- Balanza
- Auto clave
- Pinzas
- Tijeras
- Agua destilada
- Pipetas
- Embudo de vidrio
- Vaso precipitado
- Mechero de bunsen
- Tubos de ensayo roscables
- Matraz
- Frascos de vidrio esterilizados
- Mechero
- Cajas petri esterilizadas

- Agar, papa, dextrosa
- Agar, extracto de malta

El 06 de noviembre 2016 se procedió a recolectar siete muestras de suelo de la rizósfera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).



Figura 4. Recolección de muestras de suelo en el cultivo de caña de azúcar.

Los aislamientos se realizaron en medio de cultivo Agar papa dextrosa (PDA) y Agar Extracto de Malta (MEA).

Se incubaron a 22 °C durante siete días, se conservaron entre 2-4 °C y se depositaron en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos del CEBA.

Identificación

La identificación de la cepa se realizó en el laboratorio especializado IDgen – Identificación molecular, ubicado en la ciudad de Quito dirección Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro.

Se utilizaron dos muestras de cepas de *Trichoderma spp.*, con los siguientes códigos:

Tabla 5. Códigos de muestras de *Trichoderma spp.*

CULTIVO	CODIGO MUESTRA
F	CEBA-IANCEY-TH15-16
G	CEBA-IANCEY-TH07-16

Representa la codificación de las muestras. Fuente: Autor

En la figura 5, se observa el cultivo puro de *Trichoderma spp.*

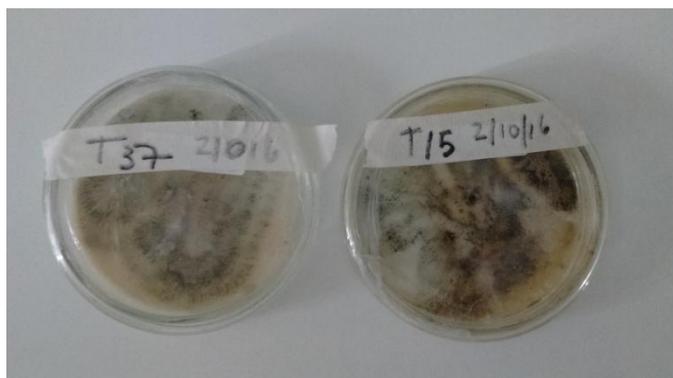


Figura 5. Cultivos axénicos de *Trichoderma spp.*

Se utilizó la identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos). Los protocolos fueron desarrollados y probados por el laboratorio IDgen, los detalles técnicos se presentan en el informe Nro. A – 016 (Anexo 1).

Los protocolos para la “Secuenciación de ADN total genómico proveniente de tejido fúngico” se presentan el informe *Detalle de protocolos* presentado por el laboratorio IDgen (Anexo 2).

La búsqueda en la base de datos Genbank, de la secuencia obtenida permitió identificar a las muestras analizadas (F y G) como *Trichoderma asperellum*.(IDgen, 2017) (Anexo 2).

Caracterización

Se realizó la caracterización en el laboratorio de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, que se encuentra ubicada en la siguiente dirección: Panamericana Sur Km. 1, Sector Cutuglagua, Cantón Mejía, Pichincha; se realizó el Análisis Proximal (Bromatológico) método MO-LSAIA-01, método referencial U. Florida 1970 y Minerales Totales, método MO-LSAIA-03, método referencial U. Florida 1980; para realizar estos análisis se utilizó 2Kg de cepa pura de *T. asperellum*, que se obtuvo en el laboratorio del CEBA.

2.1.2 Resultados

Aislamiento

En la figura 04, se presentan las muestras de suelo recolectadas en un cultivo de caña de azúcar para obtener la *Trichoderma spp.*



Figura 6. Muestra de suelo recolectada en el cultivo de caña

En las figuras 7 y 8 se presenta el proceso de preparación de medios de cultivo PDA y MEA.



Figura 7. Preparación de medios de cultivo PDA.



Figura 8. Esterilización de medios de cultivo

En las figuras 9 y 10 se presenta el proceso para inocular los medios de cultivo y obtener las cepas de *Trichoderma spp.*



Figura 9 Preparación de muestras de suelo para inocular los medios de cultivo PDA y MEA.

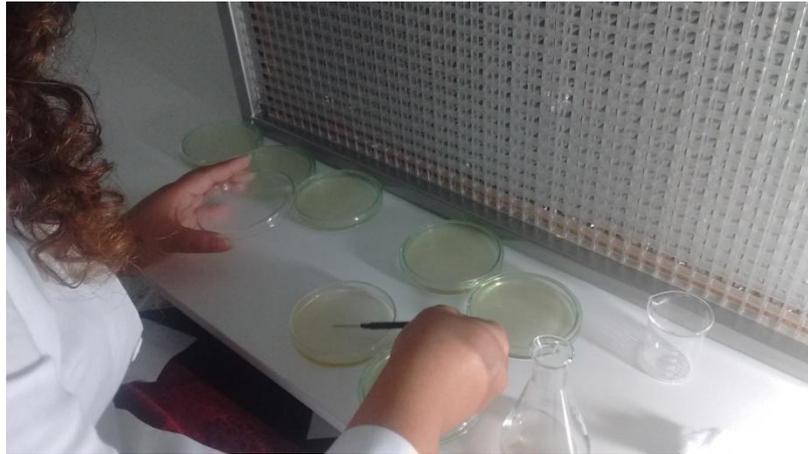


Figura 10. Inoculación de medios de cultivo.

En la figura 11 se presentan las cepas de *Trichoderma spp.*



Figura 11, cepas de *Trichoderma spp.*, obtenida en laboratorio.

Identificación

Una vez realizado el estudio de identificación se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 6. Resultados de la identificación

Codificación	Muestra	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Accesoión
F	CEBA- IANCEY- TH15-16	557	52.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	ITS	99	KX146490.1
G	CEBA- IANCEY- TH7-16	562	79	<i>Trichoderma asperellum</i>	ITS	100	KX146490.1

La tabla representa los datos obtenidos en la identificación realizada por IDgen. Fuente (IDgen, 2017)

La búsqueda en la base de datos Genbank, de la secuencia obtenida permitió identificar a las muestras analizadas (F y G) como *Trichoderma asperellum*. (IDgen, 2017).

La especie se clasifica en:

Reino: Hongos

Filo: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Especie: *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. Y Nirenberg, 1999

Estos datos se tomaron de la Infraestructura Mundial de Información en Biodiversidad (Gbif, 2017).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Se recolectaron siete muestras de suelo de la rizósfera de caña de azúcar de un cantero ubicado en el Ingenio Azucarero del Norte.

Se aislaron cepas puras de *Trichoderma spp.*, en medio de cultivo Agar papa dextrosa (PDA) y Agar Extracto de Malta (MEA). Se utilizó la identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos). Los productos de PCR fueron adecuados y enviados a secuenciación, para su posterior ensamblaje y depuración mediante el programa bioinformático Geneious. De las muestras analizadas se obtuvo como resultado *Trichoderma asperellum*, para la identificación se utilizó la base de datos GenBank. Este análisis lo realizó el laboratorio especializado IDgen.

Caracterización

Se obtuvieron los siguientes resultados:

En la Tabla 7 se presentan los resultados del análisis proximal realizado a la muestra de *Trichoderma asperellum*, en el laboratorio del INIAP.

Tabla 7 Resultados del análisis proximal de *T. asperellum*.

ANALISIS PROXIMAL						
	HUNEDAD	CENIZAS	E.E	PROTEINA	FIBRA	E.L.N
UNIDAD	%	%	%	%	%	%
	49,46	1,86	1,64	16,74	3,02	76,74

Fuente: Informe ensayo Nro. 17-152 INIAP.

En la Tabla 8 se presentan los resultados del análisis de Minerales totales.

Tabla 8 Resultados del análisis de Minerales Totales.

ANALISIS MINERALES TOTALES					
	Ca	P	Mg	K	Na
UNIDAD	%	%	%	%	%
	0,06	0,38	0,13	0,44	0,01
	Cu	Fe	Mn	Zn	
UNIDAD	ppm	ppm	ppm	ppm	
	1	36	18	23	

Fuente: Informe ensayo Nro. 17-152 INIAP.

2.1.3 Discusión

Para aislar *Trichoderma* es recomendable utilizar agar rosa de bengala (Cubillos et al., 2014), se aísla y propaga *Trichoderma spp.*, en PDA (Nongmaithem, Roy, & Bhattacharya, 2016); (Reyes Ramírez et al., 2012); (Asran-Amal et al., 2010); (Elfita, Munawar, Muharni, & Sudrajat, 2014); (Saad Al-Hazmi & Tariqjaveed, 2016); (Ortiz et al., 1995), en el presente estudio se re realizó el aislamiento en dos medios de cultivo PDA y MEA.

La incubación de la cepa en el experimento se realizó a 22 °C durante siete días; Ortiz et al., (1995) realizó la incubación de *Trichoderma harzianum.*, a 30° C durante 48 horas obteniendo cepas más resistentes a la liofilización que aquellas que se obtienen a los 14 días de incubación; *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. viride* se cultivaron a 30 °C en medio PDA durante siete días (Ismail, Abo-Elmagd, & Housseiny, 2016).

Bravo et al., (2016) realizó la identificación molecular de un aislado de *Trichoderma spp.* utilizando la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal y el programa BLAST

obteniendo como resultado *T. asperellum* numero de acceso JX270638.1 97, cobertura 97% y 99% de hemología, en el presente experimento se realizó la identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos) utilizando el programa bioinformático GENEIOUS, obteniendo como resultado *T. asperellum* de la muestra CEBA-IANCEY-TH15-16 con un 99% de identidad y *T. asperellum* de la muestra CEBA-IANCEY-TH7-16 con un 100% de identidad y número de accción KX146490.1; se identifico a *T. asperellum* utilizando la base de datos del GenBank, coincidiendo con la con la identificación realizada por: Loc et al., (2011); Alvarado & Rivera, (2016); Mendoza et al., (2011); Huang et al., (2015) y Bravo et al., (2016), como alternativas para la identificación se puede usar la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica y en el International Subcommittee on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy. La conservación de la cepa se la realizó a 2-4 °C coincidiendo con (Nongmaithem et al., 2016)

2.2 Protocolo de conservación para la especie *Trichoderma asperellum* por liofilización.

El objetivo del presente estudio es la conservación de *Trichoderma asperellum* utilizando la liofilización.

2.2.1 Materiales y métodos

Ubicación

Para la liofilización se utilizaron los equipos del laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales – FICAYA que se encuentra ubicado en la Universidad Técnica del Norte Av. 17 de julio, sector el Olivo.

Procedimiento

Las cepas de *Trichoderma asperellum* utilizadas para la liofilización fueron las producidas en el experimento anterior. Se utilizaron tubos de ensayo roscables de 10ml que se inocularon con las cepas puras de *Trichoderma asperellum*.

Liofilización

Se utilizó el equipo “VirTis wizard 2.0”, para el Tratamiento térmico (thermal treatment) y secado primario (primary drying) se siguieron los siguientes pasos que se los describe a continuación:

Tabla 9. Tratamiento térmico (Thermal treatment)

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Paso 1	15	120
Paso 2	0	120
Paso 3	-10	120
Paso 4	-15	120
Paso 5	-20	120
Paso 6	-30	120
Paso 7	-40	120

La tabla muestra los pasos que se siguieron para realizar el tratamiento térmico. Fuente: Autor

Tabla 10. Secado primario (Primary drying)

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Vacio (atm)
Paso 1	-40	120	300
Paso 2	-30	120	300
Paso 3	-20	120	300
Paso 4	-10	120	300
Paso 5	0	120	300
Paso 6	10	120	300
Paso 7	20	120	300
Paso 8	30	120	300
Paso 9	40	120	300

La tabla muestra los pasos que se siguieron para realizar el secado primario. Fuente: Autor

Las cepas puras liofilizadas fueron trasladadas al banco de recursos genéticos del Centro Ecuatoriano de biotecnología y ambiente – CEBA.

Recuperación de cultivos liofilizados

La metodología utilizada es la recomendada por Escandino (2017) de la Colección Española de Cultivos Tipo; los tubos que contienen el cultivo liofilizado deben estar conservados a temperatura controlada y protegidos de la luz.

Para la recuperación de cultivos liofilizados se requiere de los siguientes materiales básicos:

Cámara de flujo laminar, medio de cultivo, pipetas pasteur estériles, pipetero, recipiente con alcohol, agua estéril, pinzas metálicas.

Procedimiento

Se saca el tapón de algodón, se carga una pipeta pasteur estéril con el medio de cultivo, el volumen para rehidratar el cultivo será 0,2 – 0,3 ml del medio líquido estéril. Resuspender cuidadosamente el cultivo liofilizado introduciendo el medio líquido, aspirando y expulsando varias veces la suspensión de células con la pipeta evitando la formación de burbujas, dejar la suspensión durante 20 o 30 minutos hasta conseguir una rehidratación completa.

La suspensión conseguida se utiliza para inocular un medio de sólido (tubo con agar inclinado o placa petri), hay que utilizar todo el volumen ya que no se recomienda guardar parte de la suspensión.

Por último hay que incubar los medios de cultivos inoculados en la temperatura y condiciones recomendadas (Escandino, 2017).

2.2.2 Resultados

Liofilización

Tratamiento térmico (Thermal treatment). Para realizar el tratamiento térmico se siguieron siete pasos que se describen a continuación:

Se inició con una temperatura a 15 °C por 120 min, luego a 0 °C por 120 min y progresivamente se disminuye la temperatura hasta llegar a -40 °C todo el proceso transcurrió en 14 horas.

Secado primario (Primary drying), se inició en -40 °C por 120 min a 300 atm, aumentando la temperatura 10 °C cada 120 min, con el vacío de 300 atm constante hasta llegar a los 40 °C, este proceso tomó 18 horas en total.

El control del equipo “VirTis wizard 2.0” es computarizado, en el software del liofilizador se le designó el nombre de RECETA PRINC.rcw para realizar todo el proceso automatizado.

En la figura 12, el equipo liofilizador “VirTis wizard 2.0” utilizado para el proceso de liofilización.



Figura 12. Equipo liofilizador “VirTis wizard 2.0” Fuente: Autor

En la figura 13, se muestran los valores con los que se trabajó en el equipo liofilizador.

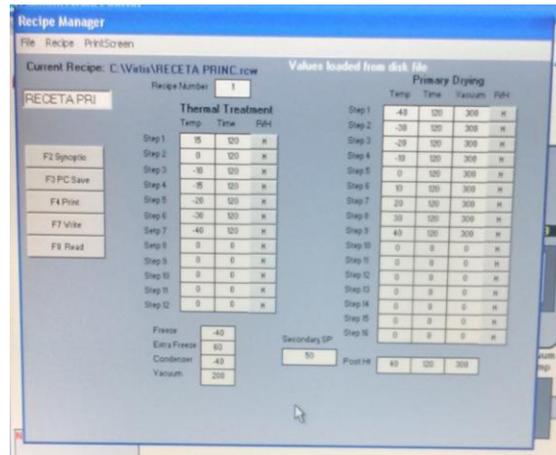


Figura 13. Valores del proceso automatizado del liofilizador. Fuente: Autor

En la figura 14, se muestran los tubos inoculados con *Trichoderma asperellum*, que se utilizaron para la liofilización.



Figura 14. Se presenta los tubos con cultivo de *Trichoderma asperellum*.

En la figura 15, se muestran los cultivos de *T. asperellum* liofilizados.



Figura 15. Cultivos de *Trichoderma asperellum* liofilizados.

Recuperación de cultivos liofilizados

Se obtuvo cepas viables de *Trichoderma asperellum* utilizando la metodología propuesta por la Colección Española de Cultivos Tipo.

2.2.3 Discusión

Se obtienen esporas viables de *Trichoderma spp.* utilizando el liofilizador (LAB CONCO Frezzy Dry System/Free Zone 4.5) a 133×10^{-3} MBar a una temperatura de -55°C , por 24 horas (Galarza, 2011); en este estudio se presenta un protocolo alternativo para la conservación de *Trichoderma asperellum* utilizando el equipo “VirTis wizard 2.0”, se aplicó un tratamiento térmico y secado primario, con un vacío de 300 atm durante 32 horas a una temperatura que oscila entre los -40°C y 40°C obteniendo así cepas viables de *Trichoderma asperellum*. Marcello et al., (2010) liofilizó y se almacenó *T. asperellum* a -20°C hasta su uso.

Es recomendable conservar por liofilización a *Trichoderma spp.* (Cárdenas, 2010; Gato, 2010), en el presente estudio se recomienda conservar cepas de *T. asperellum* por liofilización, ya que con el protocolo propuesto se obtienen cepas viables durante la recuperación del cultivo liofilizado.

2.3 Determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa de *Trichoderma asperellum*.

Este experimento tiene como objetivo seleccionar el mejor medio de cultivo para la producción de *Trichoderma asperellum*., a través de la velocidad de crecimiento radial.

Se utilizó la metodología propuesta por Pineda, Ramos, Soto, Freitas, & Pereira, 2015.

2.3.1 Materiales y métodos

Cepa: se utilizó las cepas de *Trichoderma asperellum*, del banco de recursos genéticos microbianos del CEBA la cual fue liofilizada en el experimento anterior y codificada como CEBA-IIIE-TA-010116.

Diseño experimental: la experimentación se planificó con un diseño completamente al azar (DCA) con 11 réplicas y completamente aleatorio. El factor de estudio fue el medio de cultivo Agar papa dextrosa (PDA) y Agar Extracto de Malta (MEA), como variable de respuesta se estableció la velocidad de crecimiento radial de la cepa liofilizada. Los parámetros de operación como la temperatura y el tiempo se mantuvieron constante a 22°C y seis días respectivamente, como factor de ruido se identificó el nivel de luz.

Se plantean las siguientes hipótesis:

Ho: El crecimiento radial es igual en medio PDA y medio MEA.

Ha: El crecimiento radial es diferente en el medio PDA y medio MEA.

2.3.2 Resultados

En la Tabla 11 se presenta los resultados experimentales sobre el crecimiento radial promedio medido en mm, a partir del cual se calcula la velocidad de crecimiento radial a través de la siguiente fórmula:

$$V(\text{mm/día}) = \text{radio promedio de la colonia (mm)} / 6 \text{ días}$$

Tabla 11 Datos de la velocidad de crecimiento radial en los medios de cultivo

Nro.	Bloque	Medio	Crecimiento radial promedio (mm)	Velocidad (mm/día)
1	1	MEA	43	7,2
2	1	PDA	50	8,3
3	1	MEA	42	7
4	1	MEA	42	7
5	1	PDA	48	8
6	1	MEA	43	7,2
7	1	MEA	44	7,3

8	1	MEA	43	7,1
9	1	MEA	44	7,3
10	1	PDA	48	8
11	1	PDA	50	8,3
12	1	PDA	49	8,2
13	1	PDA	50	8,3
14	1	MEA	42	7
15	1	MEA	42	7
16	1	MEA	43	7,2
17	1	PDA	48	8
18	1	PDA	49	8,2
19	1	PDA	48	8
20	1	PDA	48	8
21	1	PDA	50	8,3
22	1	MEA	42	7

Resumen Estadístico para Velocidad

En la Tabla 12 se presenta el resumen estadístico, como se observa esta tabla muestra diferentes estadísticos de velocidad para cada uno de los dos niveles de medio. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles, enlistados aquí bajo la columna de promedio.

Tabla 12. Resumen Estadístico para Velocidad

<i>Medio</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>	<i>Coficiente de Variación</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Rango</i>	<i>Sesgo Estandarizado</i>
MEA	11	7,12	0,12	1,76%	7	7,3	0,3	0,46
PDA	11	8,15	0,14	1,77%	8	8,3	0,3	-0,02

<i>Medio</i>	<i>Curtosis Estandarizada</i>
MEA	-1,15
PDA	-1,51
Total	-1,85

Análisis de varianza (ANOVA)

En la tabla 13 se presenta el análisis de varianza para la velocidad por medio, como se observa la tabla ANOVA descompone la varianza de Velocidad en dos componentes: un

componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La razón -F, que en este caso es igual a 319,225, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor -P de la prueba -F es menor que 0,05; existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Velocidad, entre un nivel de Medio y otro, con un nivel del 95,0% de confianza. Se requiere de precisión para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras por lo que se seleccionó Pruebas de Múltiples Rangos para realizar el análisis.

Tabla 13. ANOVA para Velocidad por Medio

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5,80	1	5,80	319,22	0
Intra grupos	0,36	20	0,02		

Tabla de medias

En la Tabla 14 se presenta la tabla de medias, esta tabla muestra la media de Velocidad para cada nivel de Medio. También muestra el error estándar de cada media, el cual es una medida de la variabilidad de su muestreo. El error estándar es el resultado de dividir la desviación estándar mancomunada entre el número de observaciones en cada nivel. La tabla también muestra un intervalo alrededor de cada media. Los intervalos mostrados actualmente están basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Están contruidos de tal manera que, si dos medias son iguales, sus intervalos se traslaparán un 95,0% de las veces.

Tabla 14. Medias para Velocidad por Medio con intervalos de confianza del 95,0%

<i>Medio</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i>		
			<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
MEA	11	7,12	0,04	7,06	7,18
PDA	11	8,15	0,04	8,08	8,20

Gráfico de medias

En la figura 16, se presenta el gráfico de medias, como se observa no existe solapamiento entre los intervalos de las medias por lo que se concluye que existe diferencia significativa para la velocidad de crecimiento y los dos medios de cultivos.

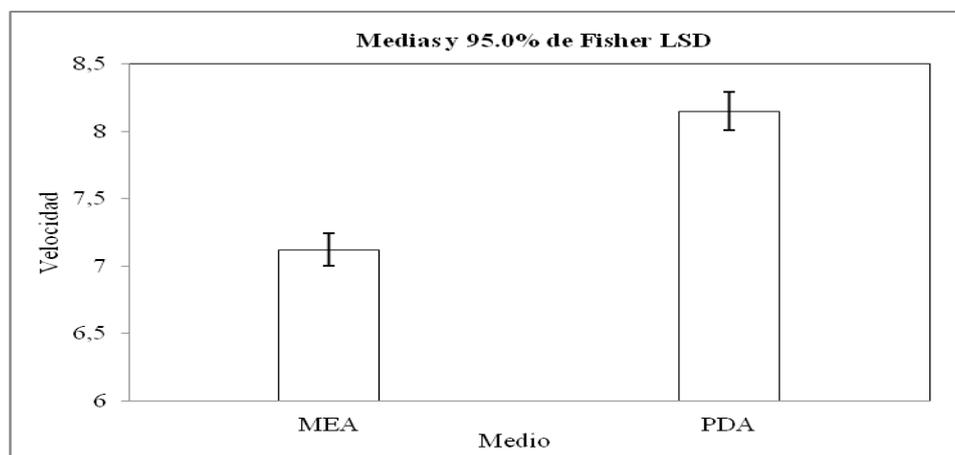


Figura 16. Gráfico de medias para velocidad de crecimiento radial.

Pruebas de Múltiple Rangos para Velocidad por Medio (Método: 95,0 porcentajes LSD).

En la tabla 13 se presenta la prueba de rangos múltiples, esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a un par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado dos grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

En la Tabla se presentan los resultados de Múltiples Rangos para velocidad por Medio, Método: 95,0 porcentajes LSD.

Tabla 15. Pruebas de Múltiple Rangos para velocidad por Medio, Método: 95,0 porcentajes LSD.

Medio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MEA	11	7,12	X
PDA	11	8,15	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
MEA - PDA	*	-1,03	0,12

* indica una diferencia significativa.

En la figura 17 se presenta la técnica de medición de la velocidad de crecimiento de *Trichoderma asperellum*, la cual fue realizada utilizando una cinta métrica.

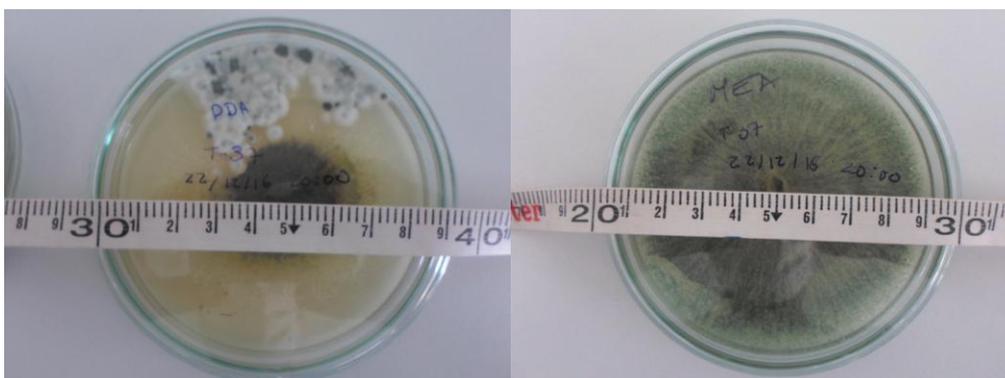


Figura 17. Medición de la velocidad de crecimiento de *Trichoderma asperellum*.

2.3.3 Discusión

La medición se realizó utilizando la metodología propuesta por Pineda et al., 2015; esta metodología ha sido utilizada también en la medición de crecimiento radial de *Pleurotus ostreatus* (Pineda, 2014), la metodología también ha sido utilizada por Batista & Gato, (2010) en la medición de crecimiento radial de *T. harzianum*., y *T. gamsii* (J. L. Chen et al., 2015).

Reyes Ramírez, Alejo, Ruiz Sánchez, María, & Suárez, (2012) obtuvieron 65,3 (\pm 1,1) mm de crecimiento de las cepas de *Trichoderma harzianum* (Th – itver), *Trichoderma* H2, *Trichoderma* P3 y *Trichoderma* P4 cepas nativas aisladas a partir de muestras de suelo en Yucatán, México, a los tres días de incubación a 30 °C, que correspondió al crecimiento total en el medio PDA en la caja petri.

En el presente experimento se obtuvo 8,15 mm/día de crecimiento radial en PDA a 22 °C; otros autores mencionan que la temperatura óptima de crecimiento de *T. asperellum* se encuentra entre los 27-30 °C y máximo 35 °C en medio de cultivo PDA (Guigón-lópez et al., 2010); para *Trichoderma cremeoides* en PDA después de 72 horas presenta crecimiento radial de 16-17 mm a 15 °C; 29-30 mm a 25 °C y 6-9 mm a 30 °C (Jaklitsch & Voglmayr, 2015).

2.4 Catálogo de cepas puras de *Trichoderma* spp.

El objetivo de este acápite es una herramienta que brinda a estudiantes e investigadores un fácil manejo de las cepas, puesto que proporciona información específica para el uso de las cepas nativas.

2.4.1 Uso de catálogo

La información de las cepas contiene el nombre científico, el código asignado, procedencia, medio de cultivo, temperatura de crecimiento y conservación de la cepa de *T. asperellum* aislada en el laboratorio del CEBA. Además se presenta cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y el Instituto Cubano de Investigación de los derivados de la caña de azúcar (ICIDCA).

2.4.2 Medios de cultivos

- Agar nutriente (AN)
- Glucosa, peptona y extracto de levadura (YPG)

- Papa Dextrosa Agar (PDA)
- Czapek Agar Dox
- Sabouraud Maltosa Agar (SMA)
- Czapek concentrado
- Czapek Extracto de Levadura Agar (CYA)
- Extracto de Malta Agar (MEA)
- 25 % Glycerol Nitrate Agar (G25N)
- Czapek Extracto de Levadura Agar con 20 % Sacarosa (CY20S)
- MRS líquido
- MRS sólido
- Medio B

Tomado de (ICIDCA, 2003)

2.4.3 Medios y condiciones de cultivo de *Trichoderma asperellum* CEBA-IIIE-TA-010116

Medio de cultivo

Agar Extracto de Malta (MEA)

Agar Papa Dextrosa (PDA)

Temperaturas de crecimiento

Trichoderma asperellum 24 - 25°C

Tiempo de incubación

Siete días

Conservación

Por liofilización

2.4.4 Formula medio de cultivo

Agar Papa Dextrosa (PDA)

Papa deshidratada	250.0 g
Glucosa	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 mL

Agar Extracto de Malta (MEA)

Extracto de malta en polvo	20.0 g
Peptona	1.0 g
Glucosa	20.0 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	750.0 mL

2.4.5 Suministro de cultivos

En el presente catalogo se presenta una cepa nativa aislada en el laboratorio del CEBA, el objetivo es que a futuro este a disposición de aquellos que trabajen en investigación, producción y que asuman la responsabilidad sobre el manejo y uso de la cepa.

Las cepas deberán estar debidamente empacadas etiquetadas con toda la información necesaria acerca de las condiciones de crecimiento, almacenamiento, manipulación del mismo y forma de recuperación del cultivo liofilizado (ICIDCA, 2003).

2.4.6 Conservación de los cultivos

Por liofilización con el uso del equipo “VirTis wizard 2.0”,

2.4.7 Identificación

Identificación molecular de microorganismos y la base de datos del GenBank en el laboratorio especializado IDgen.

2.4.8 Depósito de cultivos

Se debe presentar una solicitud por escrito con toda la información del cultivo para su posterior aprobación una vez que se realicen los estudios necesarios.

2.4.9 Precios de cepas y otros servicios

Con fines investigativos \$40 USD

Para la Industria \$120 USD

Con fines docentes \$60 USD

2.4.10 Listado de Trichodermas disponibles

En la tabla 14, se presenta un listado de cepas de Trichoderma incluida la aislada en el presente trabajo de investigación, esta tabla servirá como modelo para el catálogo.

Tabla 16 Listado de cepas de Trichoderma.

Es pecie	Código	Medio de Cultivo	Foto	Fuente
<i>Trichoderma asperellum</i>	CEBA-IIE-TA-010116	PDA, MEA		Autor
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	H/101-8-2	PDA, MEA		(ICIDCA, 2003)

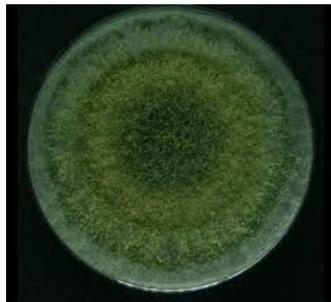
Figura 18, Cultivo de *Trichoderma asperellum* en MEA y PDA. Fuente: Autor.



Figura 19 *Trichoderma harzianum* Rifai
Fuente: (Nature Agrocare & Research Pvt. Ltd. (NARPL), 2017)

Trichoderma viride Pers ex H/101-25-1 Fries

PDA, MEA

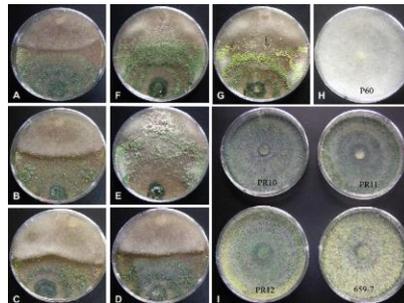


(ICIDCA, 2003)

Figura 20 *Trichoderma viride*.
Fuente: (Indianmart, 2017).

Trichoderma asperellum Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg 1999
CECT 2941

PDA, MEA



(Centro Español de Cultivos Tipo, 2017)

Figura 21. Antagonismo de *Trichoderma asperellum*. Fuente:(Mbarga et al., 2012).

2.4.11 Descripción de las cepas

Trichoderma asperellum

CEBA-III- TA-010116. Procedente del Centro de Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA) Ibarra - Ecuador.

Medio de cultivo de crecimiento: 3, 8

Temperatura incubación 25 °C

Medio de cultivo de mantenimiento y conservación: 3, 8

Temperatura incubación 4-8 °C

Medio en el que obtiene mejor velocidad de crecimiento radial: 3

***Trichoderma harzianum* Rifai**

H/101-8-2. T- 18. Procedente de la Universidad Josef Szeded. Hungría. (1989)

Medio de cultivo de crecimiento: 4, 5, 8

Temperatura incubación 28-30 °C

Medio de cultivo de mantenimiento y conservación: 4, 8

4-8 °C

Medio para clasificación: 7, 8, 9

***Trichoderma viride* Pers ex Fries.**

H/101-25-1. Aislada de una muestra de bagazo en el ICIDCA. Cuba (1977)

Medio de cultivo de crecimiento: 4, 5, 8

Temperatura incubación 28-30 °C

Medio de cultivo de mantenimiento y conservación: 4, 8

Temperatura incubación 4-8 °C

Medio para clasificación: 7, 8, 9

***Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg 1999**

CECT 2941. Aislada de una muestra de suelo en Carimagua, Colombia,

Medio de cultivo de crecimiento: 3, 8

Medio de cultivo de mantenimiento y conservación: 3, 8

Temperatura incubación 24 °C

***Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg 1999**

CECT 20268. Aislada de una muestra de suelo Matapozuelos (Valladolid), España.

Medio de cultivo de crecimiento: 3

Medio de cultivo de mantenimiento y conservación: 3

Temperatura incubación 25 °C

2.4.12 Recuperación de cultivos liofilizados

Se recomienda la metodología de la Colección Española de Cultivos Tipo (Escandino, 2017).

2.4.13 Especificaciones de cultivos microbianos

De:

Nombre del cultivo:

Otros nombres (sinónimos):

Número de la cepa:

Tipo de organismo:

Cantidad de unidades y tipo:

Lugar de procedencia:

Producto o substrato del cual se aisló:

Fecha de aislado y de ingreso:

Medios en el que se conserva:

Temperatura de conservación:

Condiciones del cultivo:

Otras informaciones:

Fecha de solicitud:

Bajo la supervisión y autorización de:

2.4.14 Ficha para el depósito de cepas en el banco de recursos genéticos

Número en el Banco de Recursos Genéticos (BRG):

Fecha de ingreso:

Tipo de microorganismo:

Nombre científico del microorganismo:

Número de la cepa en otras colecciones:

Aislada por: a partir de:
con fecha:

Si no ha sido aislada por el depositante, indique cómo la recibió:

.....

Identificada por:

Características morfológicas:

Características fisiológicas:

Temperatura de almacenamiento:

Clase:

Medio de cultivo:

Temperatura óptima de crecimiento:

¿Resiste la liofilización?

¿Resiste la congelación?

Referencias de trabajos publicados relacionados con estas cepas y sus propiedades:

.....

Otros comentarios sobre la cepa:

Nombre y dirección del depositante:

Fecha y firma del depositante:

3. CONCLUSIONES

- Se desarrolla un protocolo para el aislamiento, identificación y caracterización de una cepa nativa de *Trichoderma asperellum*, obtenida de la plantación de caña del Ingenio Azucarero del Norte. La cual se depositó en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos del CEBA. De igual forma se logra establecer un protocolo para la conservación de la cepa por la técnica de liofilización y por último se mide la velocidad de crecimiento radial de las células filamentosas del Trichoderma, concluyendo con una propuesta de catálogo de cepas fúngicas nativas. Estos resultados representan una novedad científica y un aporte al desarrollo biotecnológico del país, permitirá que la comunidad científica ecuatoriana pueda utilizar dichos recursos con fines de investigación o producción tanto de metabolitos secundarios como primarios con fines a su aplicación en la industria agrícola, alimentos, ambiente, energía e industria. Los resultados contribuyen directamente con la conservación sustentable de los recursos naturales del país y específicamente de la biodiversidad fúngica ecuatoriana. Por otro lado la investigación impacta directamente en la protección de los recursos genéticos del país y protege contra la Biopiratería.
- El estudio de especies nativas para el control de plagas y enfermedades en la agricultura es de gran importancia ya que estas brindan estabilidad a los ecosistemas, logrando así disminuir el uso de agroquímicos y obteniendo productos amigables con el ambiente.
- El estudio está limitado por la falta de información específica sobre cepas fúngicas nativas del Ecuador, además se requiere de mucho tiempo para determinar los años de viabilidad de las cepas liofilizadas; por lo que los resultados aquí

mostrados son el punto de partida para investigaciones adicionales sobre la especie identificada.

- La propuesta del catálogo de cepas nativas de *Trichoderma spp.*, representa un aporte como herramienta para la capacitación de la comunidad científica y población en general.

4. RECOMENDACIONES

- Establecer un Banco de Recursos Genéticos y aislar cepas nativas de *Trichoderma spp.*, de otros sectores para enriquecerlo.
- Realizar estudios de antagonismo de la cepa aislada en enfermedades del cultivo de caña de azúcar a escala de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelin, E., Servy, C., Martin, M.-T., Arcile, G., Iorga, B. I., Retailleau, P., ... Ouazzani, J. (2014). Bicyclic and tetracyclic diterpenes from a *Trichoderma* symbiont of *Taxus baccata*. *Phytochemistry*, *97*, 55–61. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.10.016>
- Agamez, E. Y., Zapata, R. I., Oviedo, L. E., & Barrera, J. L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp . Evaluating solid fermentation processes and substrates for producing *Trichoderma* sp . spores. *Rev. Colomb. Biotecnol*, *10*(2), 23–34.
- Agamez, E., Zapata, R., Oviedo, L., & Barrera, J. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23–34.
- Ahamed, A., & Vermette, P. (2008). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, *40*(3), 399–407. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.030>
- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, *2*(1), 1–12. <http://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Al Hazmi, A. S., & TariqJaveed, M. (2016). Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *23*(2), 288–292. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007>
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). *World Agriculture: towards 2015-2030: the 2012*

revision (No. 12–3). Rome.

Alvarado, L., & Rivera, W. (2016). Molecular Identification of *Trichoderma* spp. in Garlic and Onion Fields and In Vitro Antagonism Trials on *Sclerotium cepivorum*. *Sociedade Brasileira de Ciência Do Solo*, v40:e01504, 9. <http://doi.org/10.1590/18069657rbcS20150454>

Arango, M., Ordoñez, N., Castañeda, E., & Restrepo, A. (1988). *Manual Hongos contaminantes del laboratorio*. Bogotá: Instituto Nacional de Salud y Corporación para Investigaciones Biológicas.

Asran-Amal, a., Moustafa-Mahmoud, S. M., Sabet, K. K., & El Banna, O. H. (2010). In vitro antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(2), 153–157. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.02.009>

Bailey, B., Bae, H., Strem, M., Roberts, D., Thomas, S., Crozier, J., ... Holmes, K. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, 224(6), 1449–164. <http://doi.org/10.1007/s00425-006-0314-0>

Baldwin, J. E., Bansal, H. S., Chondrogianni, J., Field, L. D., Taha, A. A., Thaller, V., ... Taylor, A. (1985). Biosynthesis of 3-(3'-isocyanocyclopent-2-enylidene) propionic acid by (*bon.*) *aggr.* *Tetrahedron*, 41(10), 1931–1938. [http://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)96556-1](http://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)96556-1)

Banco Mundial [BM]. (2016). Población Mundial.

Barnet, H. L., & Hunter, B. B. (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. *Mycologia*, 64(4), 930–932.

Barnet, H. L., & Hunter, B. B. (1978). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (5th ed.). New York: MacMillan Pub. Company.

- Baroncelli, R., Zapparata, A., Piaggieschi, G., Sarrocco, S., & Vannacci, G. (2016). Draft Whole-Genome Sequence of *Trichoderma gamsii* T6085, a Promising Biocontrol Agent of Fusarium Head Blight on Wheat. *Genome Announc.*, 4(1), e01747-15. <http://doi.org/10.1128/genomeA.01747-15>
- Batista, D., & Gato, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Revista Fitosanidad*, 14(3), 189–195.
- Bélanger, R. R., Dufour, N., Caron, J., & Benhamou, N. (1995). Chronological Events Associated with the Antagonistic Properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect Evidence for Sequential Role of Antibiosis and Parasitism. *Biocontrol Sci Technol*, 5(December 2012), 41–53. <http://doi.org/10.1080/09583159550040006>
- Bettiol, W., Rivera, M., Mondino, P., Montealegre, J., & Colmenárez, Y. (2014). *Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe*.
- Bissett, J. (1984). A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62(5), 924–931. <http://doi.org/10.1139/b84-131>
- Bissett, J. (1991). Una revisión del género *Trichoderma*. III. sección *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2373–2417. <http://doi.org/10.1139/b91-298>
- Bravo, V., Ronquillo, M., Martinez, M., & Quezada, G. (2016). EFECTO ENRAIZADOR DE *Trichoderma asperellum* EN EL CULTIVO DE PALMA ACEITERA, 20–27.
- Brechelt, A. (2010). El manejo ecológico de plagas y enfermedades. Santiago de Chile: O'Reilly Media publishers.
- Campos, É., & Freire, C. (2016). Exposure to non-persistent pesticides and thyroid function: A systematic review of epidemiological evidence. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219(6), 481–497. <http://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.05.006>
- Caraballo, M. (1998). Formulación de hongos entomopatógenos. *Manejo Integrado de Plagas*, 47, 1–4.

- Cárdenas, Y. G. (2010). MÉTODOS DE CONSERVACIÓN Y FORMULACIÓN DE TRICHODERMA HARZIANUM RIFAI. *Calle*, 189(514), 189–195. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/fit/v14n3/fit08310.pdf>
- Castro, C., & Monte, E. (2000). Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp . Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp ., 66(5), 1890–1898. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1890-1898.2000>.Updated
- Centro Español de Cultivos Tipo. (2017). CATÁLOGO DE HONGOS. Retrieved July 11, 2017, from <http://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/cect/catalogo-cepas/medios-cultivo/lista-hongos/t-1285892323955.html>
- Chai, S. Y., Abu Bakar, F. D., Mahadi, N. M., & Murad, A. M. A. (2016). A thermotolerant Endo-1,4- β -mannanase from *Trichoderma virens* UKM1: Cloning, recombinant expression and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 125, 49–57. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.12.011>
- Chen, J. L., Sun, S. Z., Miao, C. P., Wu, K., Chen, Y. W., Xu, L. H., ... Zhao, L. X. (2015). Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: A promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.09.006>
- Chen, L., Liu, Y.-T., Song, B., Zhang, H.-W., Ding, G., Liu, X.-Z., ... Zou, Z.-M. (2014). Stereochemical determination of new cytochalasans from the plant endophytic fungus *Trichoderma gamsii*. *Fitoterapia*, 96, 115–122. <http://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.04.009>
- Chet, I. (1987). *Trichoderma*: application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In I. Chet (Ed.), *Innovative approaches to plant*

- disease control* (pp. 137–160). New York: Wiley. <http://doi.org/10.1086/416163>
- Chet, I., Ibar, J., & Hadar, I. (1997). Fungal antagonistic and mycoparasites. In D. T. Wick Low & B. Soderstrom (Eds.), *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships* (1st ed., pp. 165–192). New York: Springer Verlag.
- Clavijo, A., & Cotes, A. M. (1998). Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *rhizoctonia solani* y *fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate, mediante fitoinvigorización de semillas en presencia de *trichoderma koningii*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(2), 58–66.
- Clutterbuck, A. J. (2004). Stability and Instability of fungal genomes. In D. K. Arora (Ed.), *Handbook of Fungal Biotechnology* (2nd ed., pp. 69–80). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Cole, D. C., Sherwood, S., Crissman, C., Barrera, V., & Espinosa, P. (2002). Pesticides and Health in Highland Ecuadorian Potato Production: Assessing Impacts and Developing Responses. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 8(3), 182–190.
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe [CEPAL], Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], & Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA]. (2015). *Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe 2015 - 2016* (Sexta). San José: CEPAL, FAO, IICA.
- Correa, S., Mello, M., Ávila, Z. R., Braúna, L. M., Pádua, R. R., & Gomes, D. (2007). Diagnóstico fitosanitario CEPAS DE TRICHODERMA SPP . PARA EL CONTROL. *Fitosanidad*, 11, 3–9.
- Crissman, C., Cole, D. C., & Carpio, F. (1994). Pesticide Use and Farm Worker Health in Ecuadorian Potato Production. *American Journal of Agricultural Economics*, 76(3), 593–

597.

- Cubillos, C., Goretti, M., & Lizcano, R. (2014). AISLAMIENTO DE *Trichoderma* sp., EN LAS UNIDADES PRODUCTIVAS AGRÍCOLAS DEL CENTRO DE FORMACIÓN AGROINDUSTRIAL LA ANGOSTURA DE CAMPOALEGRE (HUILA), 15–20.
- Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. In A. Fiechter (Ed.), *History of Modern Biotechnology I* (1st ed., pp. 1–39). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. http://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1
- Deshpande, M. V. (1999). Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(3), 229–243. <http://doi.org/10.1080/10408419991299220>
- Dou, K., Wang, Z., Zhang, R., Wang, N., Fan, H., Diao, G., & Liu, Z. (2014). Cloning and characteristic analysis of a novel aspartic protease gene Asp55 from *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Microbiological Research*, 169(12), 915–923. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2014.04.006>
- Druzhinina, I., Kopchinskiy, A., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol*, 42(10), 813–828. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.06.007>
- Druzhinina, I. S., & Kubicek, C. P. (2016). Chapter Two – Familiar Stranger: Ecological Genomics of the Model Saprotroph and Industrial Enzyme Producer *Trichoderma reesei* Breaks the Stereotypes. *Advances in Applied Microbiology*, 95, 69–147. <http://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.02.001>
- Duarte, F. (2012). El control biológico como estrategia para apoyar las exportaciones agrícolas no tradicionales en Perú: un análisis empírico. *Contabilidad Y Negocios*, 7(14), 81–100.
- Ehrlich, P. R. (1968). *The Population Bomb*. New York: Ballantine Books.

- Elad, Y., & Kirshner, B. (1993). Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and populations of the plant pathogen *Botrytis cinerea* as modified by abiotic conditions. *Phytoparasitica*, 21(4), 303–313. <http://doi.org/10.1007/BF02981048>
- Elad, Y., Zimand, G., Aviv, T., & Chet, I. (1993). Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology*, 42, 324–332. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01508.x>
- Elfita, Munawar, Muharni, & Sudrajat, M. . (2014). Identification of New Lactone Derivatives Isolated from *Trichoderma* sp., An Endophytic Fungus of Brotowali (*Tinaspora crispa*). *Journal of Biosciences*, 21(1), 1–7. <http://doi.org/10.4308/hjb.21.1.15>
- Elósegui, O. (2006). *Metodos artesanales de Producción de Bioplaguicidas a partir de Hongos Entomopatógenos y Antagonistas*. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
- Escandino, A. (2017). *INSTRUCCIONES PARA LA RECUPERACIÓN DE CULTIVOS LIOFILIZADOS*. Valencia. Retrieved from <http://www.cect.org>
- Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I., Hermann, A., & Hayn, M. (1991). Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, 36(1), 51–65. [http://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90099-6](http://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90099-6)
- Evans, H. C., Holmes, K. A., & Thomas, S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assess-ment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2(2), 149–160.
- Faull, J. L., Graeme-Cook, K. A., & Pilkington, B. L. (1994). Production of an isonitrile antibiotic by an UV-induced mutant of *Trichoderma harzianum*. *Phytochemistry*, 36(5),

1273–1276. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89649-1](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89649-1)

- Fernández. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado De Plagas (Costa Rica)*, (62), 96–100.
- Fernandez-Larrea. (2001). *Temas interesantes acerca del control microbiológico de plagas*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
- Fernandez-Larrea, V. O. (2004). *Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad*. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
- Fernández-Larrea, O. V. (1997). Microorganismos en el control fitosanitario en Cuba: tecnologías de producción. In *III Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica - ACAO*. Villa Clara, Cuba: Universidad Central de Las Villas.
- Flores, C., Hassan, M., Corkidi, G., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2003). Producción de biomasa viable de *Trichoderma Harzianum* bajo diferentes esquemas y condiciones de fermentación. In *XVI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería de la SMMB* (pp. 2–3). Puerto Vallarta, México: Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (1996). *Declaración de Roma sobre la seguridad alimentaria mundial y plan de acción de la cumbre mundial de la alimentación* (No. 338.19 C969d). Roma.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2003). *EL Programa Especial para la Seguridad Alimentaria: Respuesta a los nuevos desafíos*.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2009a). *Cumbre Mundial sobre la Seguridad Alimentaria* (No. WSFS 2009/2). Italia.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2009b). *How to Feed the World in 2050*. High-level expert Forum 12-13 October. Rome.
- Frank, V., Tánová, G., & Takácsová, L. (1993). Effects of cadmium and mercury on growth

- and differentiation of *Trichoderma viride*. *Zentralbl Mikrobiol.*, 148, 229–232.
[http://doi.org/10.1016/S0232-4393\(11\)80096-X](http://doi.org/10.1016/S0232-4393(11)80096-X)
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337–59. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- Galarza, L. L. (2011). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE Trichoderma spp.* ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL. Retrieved from <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/30239/D-79748.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>
- Gams, W., & Bissett, J. (1998). Morphology and Identification of *Trichoderma*. In G. Harman & C. Kubicek (Eds.), *Trichoderma & Gliocladium, Enzymes, biological control and commercial applications* (2nd ed., pp. 1–34). London: Taylor & Francis.
- García, C., Mamani, M., Chávez, G., & Álvarez, M. (2016). Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(1), 20–32. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942016000100004
- García, R. (2006). Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. *Fitosanidad*, 10(4), 295–298.
- Gato, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Revista Fitosanidad*, 14(3), 189–195.
- Gato, Y., Rodríguez, D., & Elósegui, O. (2009). *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A-34: *Métodos de conservación y evaluación de sus formulados*. Universidad de La Habana.
- Gbif. (2017). *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. Y Nirenberg, 1999 - Lista de verificación Vista. Retrieved March 16, 2017, from <http://www.gbif.org/species/117815699>
- Ghisalberti, E. L., & Sivasithamparam, K. (1991). Antifungal antibiotics produced by

- Trichoderma spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 23(11), 1011–1020.
[http://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90036-J](http://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90036-J)
- Godínez, S. (2008). MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA LA PRESERVACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS. *Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 18(2), 31–37.
- Grandjean, P., Harari, R., Barr, D. B., & Debes, F. (2006). Pesticide Exposure and Stunting as Independent Predictors of Neurobehavioral Deficits in Ecuadorian School Children. *Pediatrics*, 117(3), e546–e556. <http://doi.org/10.1542/peds.2005-1781>
- Grieshop, J. I., & Winter, D. M. (1989). Agricultural pesticide accidents and prevention in ecuador. *Accident Analysis & Prevention*, 21(4), 394–398. [http://doi.org/10.1016/0001-4575\(89\)90033-X](http://doi.org/10.1016/0001-4575(89)90033-X)
- Grinyer, J., Kautto, L., Traini, M., Saucés, R. D., Junior, T., Bergquist, P., & Nevalainen, H. (2007). Proteome mapping of the Trichoderma reesei 20S proteasome. *Current Genetics*, 51(2), 79–88. <http://doi.org/10.1007/s00294-006-0108-8>
- Guigón, C., & González, P. (2004). Selección de Cepas Nativas de Trichoderma spp . con Actividad Antagónica sobre Phytophthora capsici Leonian y Promotoras de Crecimiento en el Cultivo de Chile (Capsicum annum L .). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(July), 117–124.
- Guigón-lópez, C., Guerrero-prieto, V., Investigación, C. De, Cuauhtémoc, P. C., Cp, M., Vargas-albores, F., ... Correspondencia, I. (2010). Identificación Molecular de Cepas Nativas de Trichoderma spp . su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatogenos Molecular Identification of Trichoderma spp . Strains , in vitro Growth Rate and Antagonism against Plant Pathogen Fun, 87–96.
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G. D., Bravo-Luna, L., ... Lorito, M. (2010). Identificación Molecular de Cepas Nativas de Trichoderma spp. su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo

- contra Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(2), 87–96.
- Hanke, G. (2012). El control biológico: base de la agricultura sostenible. *La Revista Agraria*, 144(13), 10–11.
- Harman, G. (1990). *The Rhizosphere*. New York: Wiley and Sons.
- Harman, G. (2000). Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on. *Plant Disease*, 84(4), 377–393.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(1), 43–56. <http://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Harman, G. E., & Kubicek, C. (1998). *Trichoderma and Gliocladium*. (V. 1, Ed.). London: Taylor and Francis.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641–655. [http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80810-1](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1)
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422–1432. <http://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Huang, Y., Mijiti, G., Wang, Z., Yu, W., Fan, H., Zhang, R., & Liu, Z. (2015). Functional analysis of the class II hydrophobin gene HFB2-6 from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Microbiological Research*, 171, 8–20. Retrieved from http://ac.els-cdn.com/S0944501314001529/1-s2.0-S0944501314001529-main.pdf?_tid=2147a03c-58b0-11e7-8f8c-00000aab0f6c&acdnt=1498290095_76991cfff36cbe650390a2ec7607f7b0
- Hurtig, A., San Sebastián, M., Soto, A., Shingre, A., Zambrano, D., & Guerrero, W. (2003). Pesticide use among farmers in the Amazon basin of Ecuador. *Arco Environ Health.*

58(4), 223–228. [http://doi.org/10.3200 / AEOH.58.4.223-228](http://doi.org/10.3200/AEOH.58.4.223-228)

ICIDCA. (2003). *Catálogo de Cepas Microbianas*. (M. Otero, Ed.). Habana, Cuba.

IDgen. (2017). *INFORME DE RESULTADOS “Identificación molecular de microorganismos (Extracción de ADN, Amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos).”* QUITO.

Indianmart. (2017). Trichoderma Viride - Suppliers, Manufacturers & Traders in India. Retrieved July 11, 2017, from <https://dir.indiamart.com/impcat/trichoderma-viride.html>

Instituto de Biotecnología. (2016). *Fundamentos y técnicas para la preservación de bacterias ,hongos y levaduras* (Universida). Bogotá.

Inter-American Development Bank [IDB]. (2016). Agriculture in Latin America by the numbers.

Ismail, A.-M. S., Abo-Elmagd, H. I., & Housseiny, M. M. (2016). A safe potential juice clarifying pectinase from *Trichoderma viride* EF-8 utilizing Egyptian onion skins. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 7. <http://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.05.001>

Jackson, A. M., Whipps, J. M., & Lynch, J. M. (1991). Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 7(4), 494–501. <http://doi.org/10.1007/BF00303376>

Jaklitsch, W. M., & Voglmayr, H. (2015). Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology*, 80, 1–87. <http://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001>

Jenkins, N. E., & Grzywacz, D. (2003). Towards the standardization of Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents. In van J. Lenteren (Ed.), *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures*. Wallingford, England: CAB International. <http://doi.org/10.1079/9780851996882.0247>

- Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2016). Challenges of Food Security – Need for Interdisciplinary Collaboration. *Procedia Food Science*, 6, 31–33. <http://doi.org/10.1016/j.profoo.2016.02.005>
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism [mdash] from biochemistry to genomics. *Nat Rev Micro*, 3(12), 937–947. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Kobayashi, M., Uehara, H., Matsunami, K., Aoki, S., & Kitagawa, I. (1993). Trichoharzin, a new polyketide produced by the imperfect fungus *Trichoderma harzianum* separated from the marine sponge *Micale cecilia*. *Tetrahedron Letters*, 34(49), 7925–7928. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61513-7](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61513-7)
- Kommanet, B. (1998). Eco Trade Manual: environmental challenges for exporting to the European Union. Rotter-dam: CBI.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., & Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*, 41(1), 37–42.
- Kremnický, L., Mastihuba, V., & Côté, G. L. (2004). *Trichoderma reesei* acetyl esterase catalyzes transesterification in water. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30(5), 229–239. <http://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.05.007>
- Kubicek, C., Komon-Zelazowska, M., & Druzhinina, I. (2008). Fungal genus *Hypocrea* / *Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 9(10), 753–763. <http://doi.org/10.1631/jzus.B0860015>
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., ... Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(4), 1–15. <http://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>

- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., & Börner, T. (1995). PCR-fingerprinting used for comparison of ex type strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. *Microbiol Res.*, *150*(4), 363–371. [http://doi.org/10.1016/S0944-5013\(11\)80017-0](http://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80017-0)
- Lamichhane, J. R., Aubertot, J.-N., Begg, G., Birch, A. N. E., Boonekamp, P., Dachbrodt-Saaydeh, S., ... Messéan, A. (2016). Networking of integrated pest management: A powerful approach to address common challenges in agriculture. *Crop Protection*, *89*, 139–151. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.011>
- Lang, B.-Y., Li, J., Zhou, X.-X., Chen, Y.-H., Yang, Y.-H., Li, X.-N., ... Zhao, P.-J. (2015). *Koninginins L and M, two polyketides from Trichoderma koningii 8662*. *Phytochemistry Letters* (Vol. 11).
- Larralde-Corona, C. P., Santiago-Mena, M. R., Sifuentes-Rincón, A. M., Rodríguez-Luna, I. C., Rodríguez-Pérez, M. A., Shirai, K., & Narváez-Zapata, J. A. (2008). Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*, 167–177. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1532-0>
- Laxminarayan, R. (2003). *Battling Resistance to Antibiotics and Pesticides: An Economic Approach*. Washington D. C.: Resources for the future.
- Leal, J. . A., Romero-Arenas, O., Rivera, T. ., & Huerta, L. M. (2015). A1-223 Producción de *Trichoderma viride* en diferentes sustratos agrícolas. In *v Congreso Latinoamericano de Agroecología* (pp. 1–5). La Plata, Argentina.
- Li, G.-H., Yang, Z.-S., Zhao, P.-J., Zheng, X., Luo, S.-L., Sun, R., ... Zhang, K.-Q. (2011). *Three new acorane sesquiterpenes from Trichoderma sp. YMF1.02647*. *Phytochemistry Letters* (Vol. 4).
- Liang, X.-R., Miao, F.-P., Song, Y.-P., Liu, X.-H., & Ji, N.-Y. (2016). Citrinovirin with a new

- norditerpene skeleton from the marine algicolous fungus *Trichoderma citrinoviride*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.08.093>
- Lieckfeldt, E., Kuhls, K., & Muthumeenakshi, S. (1998). *Molecular taxonomy of Trichoderma and Gliocladium and their teleomorphs*. London: Taylor and Francis.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G., Nirenberg, H., & Petrini, O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Appl Environ Microbiol*, 65(6), 2418–228.
- Liu, S.-Y., Liao, C.-K., Lo, C.-T., Yang, H.-H., Lin, K.-C., & Peng, K.-C. (2016). Chrysophanol is involved in the biofertilization and biocontrol activities of *Trichoderma*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 96, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.06.003>
- Loc, N. H., Quang, H. T., Hung, N. B., Huy, N. D., Thi, T., Phuong, B., ... Ha, T. (2011). *Trichoderma asperellum* Chi42 Genes Encode Chitinase. *Mycobiology*, 39(3), 182–186. <http://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.3.182>
- Love, I., & Pollanis, C. (2015). Health effects of pesticides on agricultural farmers in the developing countries of Fiji, Ecuador, the Philippines, and Costa Rica versus the United States. Atlanta: Department of Biology, Spelman College.
- Malthus, T. R. (1846). *Ensayo sobre el principio de la población*. Madrid: Est. Lit. y Tip. de Don Eusebio María del Valle y colaboradores.
- Manosalvas, R., Estrella, J., Mariaca, J., & Ribadeneira, M. (2005). *Biodiversidad y recursos genéticos: Una guía para su uso y acceso en el Ecuador* (1st ed.). Quito: EcoCiencia, INIAP, MAE y Abya Yala.
- Manuel, C., Andreu, F., Machín, G. M., & Perurena, L. M. R. (2005). La colección de cultivos de hongos del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”: funciones y retos, 57(3), 1–7.

- Marcello, C. M., Steindorff, A. S., da Silva, S. P., Silva, R. D. N., Mendes Bataus, L. A., & Ulhoa, C. J. (2010). Expression analysis of the $\text{exo-}\beta\text{-1,3-glucanase}$ from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research*, *165*(1), 75–81. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.002>
- Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P., & Jolliet, O. (2002). Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *93*(1), 379–392. [http://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00336-X](http://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00336-X)
- Martin, J. P. (1950). Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci*, *69*(3), 215–232. <http://doi.org/10.1097/00010694-195003000-00006>
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., ... Westerholm-Parvinen, A. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol*, *26*, 553–560. <http://doi.org/10.1038/nbt1403>
- Martínez-Medina, A., Roldán, A., Lloret, E., & Pascual, J. (2008). Formulación de *Trichoderma harzianum* rifai en la producción ecológica de plántulas de melón en semillero para el control de la fusariosis vascular. In *VIII Congreso científico de SEAE. "Agricultura y Alimentación Ecológica"* (pp. 1–10). Bullas, España: Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE).
- Marusia, S. (1997). Biopreparados de *Trichoderma*: Una forma de lucha efectiva contra patógenos fúngicos del suelo. *Agricultura Orgánica*, (2–3), 24–26.
- Mbarga, J. B., Ten Hoopen, G. M., Kuate, J., Adiobo, A., Ngonkeu, M. E. L., Ambang, Z., ... Begoude, B. A. D. (2012). *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection*, *36*, 18–22.

<http://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.02.004>

- Mendoza, L., Sánchez, M., García, J., Pérez, N., González, J., & Quiroz, J. (2011). Molecular and agronomic characterization of *Trichoderma* spp natives of northeastern Mexico. *Rev. Colomb. Biotecnol. Diciembre, XIII XIII(2)*, 176–185. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v13n2/v13n2a17.pdf>
- Mera-Orcés, V. (2001). The sociological dimensions of pesticide use and health risks of potato production in carchi, ecuador. In *Open Meeting of the Human Dimensions of Global Environmental Change Research Community* (p. 21). Rio de Janeiro-Brazil.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Rodríguez-Morán, ; N. L., Ariza-Flores, R., & Barrios-Ayala, ;A. (2008). PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma harzianum* Rifai EN DIFERENTES SUSTRATOS ORGÁNICOS, *14(2)*, 185–191.
- Michel-Aceves, A. C., Reyes-De la Cruz, A., Otero-Sánchez, M., Rebolledo-Domínguez, O., & Lezama-Gutiérrez, R. (2005). Potencial Antagónico de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) in vitro e Invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *23(3)*, 284–291.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador [MAE]. (2015). Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030. Quito, Ecuador.
- Monte, E., & Llobell, A. (2003). *Trichoderma* in organic agriculture. In *V World Avocado Congress* (pp. 725–733).
- Monteagudo, C., Mariscal-Arcas, M., Heras-Gonzalez, L., Ibañez-Peinado, D., Rivas, A., & Olea-Serrano, F. (2016). Effects of maternal diet and environmental exposure to organochlorine pesticides on newborn weight in Southern Spain. *Chemosphere*, *156*, 135–142. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.103>

- Montealegre, J. R., & Pérez, L. M. (2015). *Control biológico de enfermedades de las plantas en Chile* (Vol. 1). Santiago de Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.
- Monteros Guerrero, A., & Salvador Sarauz, S. (2015). Panorama agroeconómico del Ecuador: una visión del 2015. Quito: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.
- Monteros Guerrero, A., Sumba Lusero, E., & Salvador Sarauz, S. (2013). *Productividad Agrícola en el Ecuador*. Quito.
- Moore-Landecker, E. (1996). *Fundamentals of the Fungi* (4th ed.). New Jersey: Prentice Hall.
- Morales Estupiñán, C. (2001). *Las nuevas fronteras tecnológicas: promesas, desafíos y amenazas de los transgénicos*. Santiago de Chile.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). Trichoderma Research in the Genome Era. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 105–129. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- Murillo, B., Rueda, E. O., & García, J. L. (2010). *Agricultura orgánica*. México, D.F., MX: Plaza y Valdés, S.A. de C.V. Retrieved from <http://site.ebrary.com/lib/utnortesp/docDetail.action?docID=10877067>
- Nampoothiri, K. M., Baiju, T. V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 39(11), 1583–1590. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00282-6](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00282-6)
- Nature Agrocare & Research Pvt. Ltd. (NARPL). (2017). *Trichoderma Harzianum*. Retrieved July 11, 2017, from <https://www.indiamart.com/natureagrocare/culture-bank.html>
- New, A. P., Eckers, C., Haskins, N. J., Neville, W. A., Elson, S., Hueso-Rodríguez, J. A., & Rivera-Sagredo, A. (1996). Structures of polysporins A-D, four new peptaibols isolated from *Trichoderma polysporum*. *Tetrahedron Letters*, 37(17), 3039–3042.

[http://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)00463-7](http://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00463-7)

- Nongmaithem, N., Roy, A., & Bhattacharya, P. M. (2016). Screening of *Trichoderma* isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.008>
- Nora Altier, Elena Beyhaut, M. R. & F. R. (2012). Plataforma De Bioinsumos De Uso Agrícola En Base a Microorganismos Benéficos. *Inia*, 47–50.
- OCDE/FAO. (2013). *Perspectivas Agrícolas 2013-2022*. Paris.
- Oerke, E.-C., & Dehne, H.-W. (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23(4), 275–285. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.001>
- Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (2000). *Declaración del milenio. A/RES/55/2*. New York.
- Organización de las Naciones Unidas [ONU]. (2015). *Objetivos de Desarrollo del Milenio: informe de 2015*. (C. Way, Ed.).
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2002). Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor. Ginebra: OMS.
- Ortiz, M., Patiño-vera, M., Galindo, E., Escalamiento, U. De, Bioingeniería, D. De, & Post, A. (1995). Estudio sobre la liofilización de esporas de *Trichoderma harzianum*, 15, 62250.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 23, 23–54. <http://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000323>
- Penttila, M., Limón, C., & Nevalainen, H. (2004). Molecular Biology of *Trichoderma* and Biotechnological Applications. In D. K. Arora (Ed.), *Mycology, Handbook of Fungal Biotechnology* (2nd ed., pp. 412–426). New York: Marcel Dekker, Inc.

- Pérez-Guerra, N., Torrado-Agrasar, A., López-Macias, C., & Pastrana, L. (2003). Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(3), 343–350.
- Pineda, J. (2014). *Desarrollo de una tecnología para la producción a pequeña escala de la biomasa del hongo ostra (Pleurotus ostreatus)*. UNIVERSIDAD DE CAMAGÜEY “IGNACIO AGRAMONTE LOYNAZ.”
- Pineda, J., Ramos, L., Soto, C., Freitas, A., & Pereira, L. (2015). Growth of *Pleurotus ostreatus* on non-supplemented agro-industrial wastes. *Revista Técnica de La Facultad de Ingeniería Universidad Del Zulia*, 38(1), 41–49. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Luis_Ramos-Sanchez/publication/283055662_Growth_of_Pleurotus_ostreatus_on_non-supplemented_agroindustrial_wastes/links/562805af08ae04c2aead8298.pdf
- Pingali, P. L., Marquez, C. B., Palis, F. G., & Rola, A. C. (1995). The Impact of Pesticides on Farmer Health: A Medical and Economic Analysis in the Philippines. In P. L. Pingali & P. A. Roger (Eds.), *Impact of Pesticides on Farmer Health and the Rice Environment* (pp. 343–360). Dordrecht: Springer Netherlands. http://doi.org/10.1007/978-94-011-0647-4_12
- Prüss-Üstün, A., & Corvalán, C. (2005). *Preventing Disease through Healthy Environments: Towards an Estimate of the Environmental Burden of Disease*. Ginebra.
- Quezada, F., Roca, W., Szauer, M. T., Gómez, J. J., & López, R. (2005). *Bioteología para el uso sostenible de la biodiversidad. Capacidades locales y mercados potenciales*. Retrieved from www.caf.com/publicaciones
- Ramón, D., Morán, M., Costa, J., López, F., Arriola, A., Martín, A., ... Rodríguez, F. (2005). Bioteología en el Sector Alimentario. *Genoma España*, 5(2), 1–81. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Ren, J., Yang, Y., Liu, D., Chen, W., Proksch, P., Shao, B., & Lin, W. (2013). *Sequential determination of new peptaibols asperelines G-Z12 produced by marine-derived fungus Trichoderma asperellum using ultrahigh pressure liquid chromatography combined with electrospray-ionization tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A* (Vol. 1309).
- Respinis, S. De, Vogel, G., Benagli, C., Tonolla, M., Petrini, O., & Samuels, G. J. (2010). MALDI-TOF MS of Trichoderma: a model system for the identification of microfungi. *Mycological Progress*, 9(1), 79–100. <http://doi.org/10.1007/s11557-009-0621-5>
- Rey, M., Llobell, A., Monte, E., Scala, F., & Lorito, M. (2004). 9 – Genomics of Trichoderma. In *Applied Mycology and Biotechnology* (Vol. 4, pp. 225–248). [http://doi.org/10.1016/S1874-5334\(04\)80012-1](http://doi.org/10.1016/S1874-5334(04)80012-1)
- Reyes Ramírez, A., Alejo, J. C., Ruiz Sánchez, E., María, J., & Suárez, T. (2012). Inhibición del crecimiento in vitro de Fusarium sp. aislado de chile habanero (Capsicum chinensis) con hongos antagonistas. *Fitosanidad*, 16(3), 161–165. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209126907006.pdf>
- Rifai, M. (1969). A revision of the genus Trichoderma. *Mycological Papers*, 116(1), 1–56.
- Ronco, A. E., Carriquiriborde, P., Natale, G. S., Martín, M. L., Mugni, H., & C., B. (2008). Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the pampasic region. In J. Chen & C. Guô (Eds.), *Ecosystem Ecology Research Trends* (pp. 209–239). New York: Nova Science Publishers.
- Ruiz, N., Wielgosz-Collin, G., Poirier, L., Grovel, O., Petit, K. E., Mohamed-Benkada, M., ... Pouchus, Y. F. (2007). New Trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of Trichoderma longibrachiatum. *Peptides*, 28(7), 1351–1358. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.05.012>
- Ryan, M. J., & Smith, D. (2004). Fungal genetic resource centres and the genomic challenge.

- Mycological Research*, 108(12), 1351–1362. <http://doi.org/10.1017/S0953756204001650>
- Ryan, M. J., Smith, D., & Jeffries, P. (2000). A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(2), 183–186. <http://doi.org/10.1023/A:1008910006419>
- Saad Al-Hazmi, A., & Tariqjaveed, M. (2016). Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.007>
- Sánchez López, V., Martínez Bolaños, L., Zavala González, E. A., & Ramírez Lepe, M. (2012). Nuevos registros de *Trichoderma crassum* para México y su variación morfológica en diferentes ecosistemas. *Revista Mexicana de Micología*, 36, 17–26.
- Sandoval, M., & Noelting, M. (2011). Producción de conidios de *Trichoderma harzianum* Rifai en dos medios de multiplicación. *Fitosanidad*, 15(4), 215–221. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2012/CU/CU1216.xml;CU2012100103>
- Sanyang, S., Van Emden, H. F., & Moore, D. (2000). Laboratory shelf life studies of oil-formulated conidia of a locust and grasshopper pathogen *Metarhizium flvoviride* Gams & Rozsypa, in mixtures with the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin insecticide. *International Journal of Pest Management*, 46(3), 165–168. <http://doi.org/10.1080/096708700415481>
- Saravanakumara, K., Raju, V., Boopathy, N. S., Li, Y., Kandasamy, K., & Chen, J. (2015). Anticancer potential of bioactive 16-methylheptadecanoic acid methyl ester derived from marine *Trichoderma*. *Journal of Applied Biomedicine*, 13(3), 199–212. <http://doi.org/10.1016/j.jab.2015.04.001>
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo [SENPLADES]. (2013). Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017. Quito: Gobierno de la república del Ecuador.

- Smith, D., & Ryan, M. J. (2004). Current status of fungal collections and their role in biotechnology. In D. K. Arora (Ed.), *Handbook of Fungal Biotechnology* (2nd ed., pp. 527–538). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Somashekar, R. K., Kulashekar, M. D., & Prabhu, M. S. (1983). Toxicity of heavy metals to some fungi. *International Journal of Environmental Studies*, 21(3–4), 277–280. <http://doi.org/10.1080/00207238308710086>
- Species Fungorum. (2016). Index Fungorum.
- Srivastava, P., & Singh, A. (2013). In-vivo 13 study of effects of dithiocarbamates fungicide 14 (Mancozeb) and its metabolite ethylenethiourea 15 (ETU) on fresh water fish *Clarius batrachu*. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3(2), B228–B235.
- Stefanova, M. (2003). Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. como antagonista de hongos fitopatógenos. La Habana, Cuba: INISAV.
- Stephen, D. (2003). Preventing pesticide poisonings in Ecuador. Ottawa: IDRC/CRDI.
- Suárez, M. B., Sanza, L., Chamorro, M. I., Rey, M., González, F. J., Llobell, A., & Monte, E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*: Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetics and Biology*, 42(11), 924–934. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.08.002>
- Subsecretaría de Tierras y Reforma Agraria [STRA]. (2016). Resolución 114. Quito, Ecuador: Gobierno de la república del Ecuador.
- Sumpsi, J. M. (2011). La volatilidad de los mercados agrarios y la crisis alimentaria. *Revista Española de Estudios Agrosociales Y Pesqueros*, 229, 11–35.
- Sumpsi, J. M. (2012). Los retos de la agricultura para alimentar al mundo en 2050. *Tiempo de Paz*, 106, 37–48.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

- distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28(10), 2731–2739.
<http://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Thangavelu, R., Palaniswami, A., & Velazhahan, R. (2004). Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 103(1), 259–263. <http://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.026>
- Thongram, K., Sarangthem, I. D., Gourshyam, T., & Bharat, G. S. (2013). Genetic diversity and species pattern of *Trichoderma* and *Hypocrea* in Manipur using in silico analysis. *Bioinformatics*, 9(2), 106–111. <http://doi.org/10.6026 / 97320630009106>
- Torres De La Cruz, M., Ortiz García, C. F., Bautista Muñoz, C., Ramírez Pool, J. A., Ávalos Contreras, N., Cappello García, S., & De La Cruz Pérez, A. (2015). Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 947–961. <http://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012>
- Tseng, S.-C., Liu, S.-Y., Yang, H.-H., Lo, C.-T., & Peng, K.-C. (2008). Proteomic Study of Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in Response to *Rhizoctonia solani*. *J. Agric. Food Chem.*, 56(16), 6914–6922. <http://doi.org/10.1021/jf703626j>
- Universidad Nacional Abierta y a Distancia [UNAD]. (2001). Lección 13: Importancia de las enfermedades de los cultivos en el sector económico.
- Vaccarino, C., Lo Curto, R. B., Tripodo, M. M., Patané, R., & Ragno, A. (1992). Grape marc as a source of feedstuff after chemical treatments and fermentation with fungi. *Bioresource Technology*, 40(1), 35–41. [http://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90116-F](http://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90116-F)
- Valiño, E. C., Elías, A., Torres, V., Carrasco, T., & Albelo, N. (2004). Mejoramiento de la composición del bagazo de caña de azúcar por la cepa *Trichoderma viride* M5-2 en un biorreactor de fermentación en estado sólido. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(2), 145–153.
- van Mil, H. G. J., Foegeding, E. A., Windhab, E. J., Perrot, N., & van der Linden, E. (2014).

- A complex system approach to address world challenges in food and agriculture. *Trends in Food Science & Technology*, 40(1), 20–32. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.005>
- Verma, J. P., Jaiswal, D. K., Meena, V. S., Kumar, A., & Meena, R. S. (2015). Issues and challenges about sustainable agriculture production for management of natural resources to sustain soil fertility and health. *Journal of Cleaner Production*, 107, 793–794. <http://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.04.130>
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valéro, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 1–20. <http://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
- Vieira, D. C., Noldin, J. A., Deschamps, F. C., & Resgalla, C. (2016). Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. *Chemosphere*, 162, 48–54. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.046>
- Wada, S., Iida, A., Asami, K., & Fujita, T. (1996). Ion channel-forming property of trichorovin-XII, an 11-residue peptaibol from the fungus *Trichoderma viride*, in planar lipid bilayer membranes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6(19), 2275–2278. [http://doi.org/10.1016/0960-894X\(96\)00410-6](http://doi.org/10.1016/0960-894X(96)00410-6)
- Wang, Y., Gao, B. L., Li, X. X., Zhang, Z. Bin, Yan, R. M., Yang, H. L., & Zhu, D. (2015). Phylogenetic diversity of culturable endophytic fungi in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff), detection of polyketide synthase gene and their antagonistic activity analysis. *Fungal Biology*, 119(11), 1032–1045. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.07.009>
- Wei, L., Liang, Z.-H., Zhang, Z.-G., & Luo, H.-R. (2006). Effects of Peptide in the Fermentation Liquid of *Trichoderma harzianum* on Nodule Microstructure and Function of Cowpea. *Acta Laser Biology Sinica*, 1(1).
- Wilson, C., & Tisdell, C. (2001). Why farmers continue to use pesticides despite

- environmental, health and sustainability costs. *Ecological Economics*, 39(3), 449–462.
[http://doi.org/10.1016/S0921-8009\(01\)00238-5](http://doi.org/10.1016/S0921-8009(01)00238-5)
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., & Lorito, M. (2006). The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology*, 96(2), 181–185. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>
- World Health Organization (WHO), & Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2010). *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides: Guidelines for the Registration of Pesticides*. Roma.
- Yang, D., Pomraning, K., Kopchinskiy, A., Aghcheh, R. K., Atanasova, L., Chenthamara, K., ... Druzhinina, I. S. (2015). Genome Sequence and Annotation of *Trichoderma parareesei*, the Ancestor of the Cellulase Producer *Trichoderma reesei*. *Genome Announc.*, 3(4), e00885-15. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00885-15>
- Yao, L., Tan, C., Song, J., Yang, Q., Yu, L., & Li, X. (2016). Isolation and expression of two polyketide synthase genes from *Trichoderma harzianum* 88 during mycoparasitism. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(41), 12. <http://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.004>
- You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., & Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*, 101, 31–38. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.006>
- Yu, H., Li, W.-X., Wang, J.-C., Yang, Q., Wang, H.-J., Zhang, C.-C., ... Zhu, H.-J. (2015). Pestalotiopsin C, stereochemistry of a new caryophyllene from a fungus of *Trichoderma* sp. and its tautomerization characteristics in solution. *Tetrahedron*, 71(21), 3491–3494.
<http://doi.org/10.1016/j.tet.2015.03.063>
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30(2), 74–90.
<http://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>

Zhang, F., Ge, H., Zhang, F., Guo, N., Wang, Y., Chen, L., ... Li, C. (2016). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-abe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 100, 64–74.
<http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.12.017>

ANEXOS

Anexo 1. Informe Nro. A – 016 presentado por el laboratorio especializado IDgen identificación molecular.

Anexo 2. Detalle de protocolos. Secuenciación de ADN genómico proveniente de tejido fúngico, presentado por IDgen identificación molecular.

Anexo 3. Informe de ensayo Nro. 17 – 152, análisis Proximal y Minerales totales de *Trichoderma asperellum*.S