

ESTACIÓN EXPERIMENTAL TROPICAL PICHILINGUE



**DEPARTAMENTO
DE
PROTECCIÓN VEGETAL**

INFORME TÉCNICO ANUAL 2021

Mocache – Los Ríos – Ecuador

Abril, 2022

INFORME ANUAL 2021

1. **Departamento:**

Protección Vegetal.

2. **Director de la Estación Experimental:**

Dr. Luis Fernando Pinargote García (enero a septiembre)
MSc. Arturo Iván Garzón Catota (octubre a diciembre)

1

3. **Responsable del Departamento en la Estación Experimental:**

Ph.D. Danilo Isaac Vera Coello.

4. **Equipo técnico multidisciplinario I+D:**

Dra. Zoila Karina Solís Hidalgo (Fitopatología).

Mgs. Sofía Lorena Peñaherrera Villafuerte (Fitopatología).

Mgs. Rosa Elena Corozo Ayoví (Entomología, desde septiembre 2021).

MSc. Edwin José Borja Borja (Tesis doctorando).

Ing. Javier Florentino Méndez Vilela (apoyo laboratorio Entomología).

Sr. Jorge Calixto Morán Morán (apoyo actividades campo).

Sr. Jaime Vicente Carranza Sánchez (apoyo actividades campo).

5. **Financiamiento:**

- Gasto Corriente Estación Experimental Tropical Pichilingue eSIGEF.
- Gasto Inversión INIAP (Apoyo área de Producción).
- Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID).

6. **Proyectos:**

6.1. ***Análisis fitopatológico/entomológicos a muestras vegetales en el laboratorio de Fitopatología de la EET Pichilingue.***

Financiamiento:	Gasto Corriente (Producción)
Presupuesto:	1.500,00 USD.
Fecha de inicio:	1980.
Fin de proyecto:	Indefinido.

6.2. ***Etiología de la principal enfermedad de teca en Ecuador y rol de los insectos en su dispersión***

Financiamiento:	Fondos AECID
Presupuesto total del proyecto:	231.418,17 USD.
Presupuesto año 2021:	46.753,02 USD
Fecha de inicio:	Julio/2018.
Fin de proyecto:	Junio/2021.

6.3. Actividades extra POA

6.3.1. Determinar el agente causal de la muerte regresiva en cacao

Financiamiento:	Gasto corriente
Presupuesto total del proyecto:	3.000 USD
Presupuesto año 2021:	3.000 USD
Fecha de inicio:	enero/2021.
Fin de proyecto:	diciembre/2021.

2

6.3.2. *Trichoderma* spp. como inductor de resistencia en vitroplantas de banano (Musa AAA) cv. Gros Michel contra *Fusarium oxysporum* f. cubense (Smith) Snyder & Hansen.

Financiamiento:	Gasto corriente
Presupuesto total del proyecto:	1.500 USD.
Presupuesto año 2021:	700 USD
Fecha de inicio:	enero/2021.
Fin de proyecto:	diciembre/2021.

6.3.3. Efecto de fungicidas químicos y bioestimulantes sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense raza 1 a nivel de laboratorio e invernadero.

Financiamiento:	Gasto corriente
Presupuesto total del proyecto:	1.500 USD.
Presupuesto año 2021:	700 USD
Fecha de inicio:	julio/2021.
Fin de proyecto:	julio/2022.

7. Socios estratégicos para investigación:

AECID	Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo.
UE	Unión Europea.
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria de España.
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador.
GAD - Los Ríos	Gobierno Autónomo Descentralizado de Los Ríos.
MAE	Ministerio del Ambiente.
UTEQ	Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

8. Publicaciones:

Borja, E., Vera, D., Solís, K., Peñaherrera, S., Angamarca, M. & Guara-Requena, M. (2021). Eficiencia de métodos de inoculación con tres microorganismos asociados a la enfermedad "muerte regresiva" de *Tectona grandis* L.f. en Ecuador. Comunicación presentada en la XXIV Bienal de la Real Sociedad Española de Historia Natural, Valencia del 8 a 11 de septiembre de 2021. España.

Solís, K., Peñaherrera, S., Vera, D. (2021). Las enfermedades del cacao y las buenas prácticas agronómicas para su manejo. Guía No. 178. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). ISBN: 978-9942-22-531-3.

Vera Loor, M., Bernail Cabrera, A., Vera Coello, D., Leiva Mora, M., Rivero Aragón, A. Morales Díaz, I. (2021). Árbol filogenético y diversidad de bacterias endófitas asociadas a *Theobroma cacao* L. en una zona de la provincia de Esmeraldas, Ecuador. *Bioagro* 33(3): 223-228. ISSN: 1316-3361. DOI: <http://www.doi.org/10.51372/bioagro333.8>

Vera, D., Cañarte, E., Navarrete, B., Espinoza, G. y Borja, E. (2021). Manejo integrado de la enfermedad “Muerte regresiva” en teca (*Tectona grandis* L.f.). Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Ecuador. 1ra Edición. 124 p. ISBN: 978-9942-22-532-0

3

9. Participación en eventos de difusión científica, técnica o de difusión:

9.1. Ponencias

Peñaherrera, S. (16/07/2021). En las IV Jornadas Agronómicas por la Universidad Técnica de Cotopaxi realizado en modalidad ONLINE. Aplicación de *Trichoderma* spp., para el manejo de la moniliasis del cacao. La Maná, Ecuador.

9.2. Conferencista en capacitaciones a técnicos y agricultores

Corozo-Ayovi, R (07/09/2021). Charla Técnica. Monitoreo y control del picudo negro y nematodos en el cultivo de plátano. En el evento "Formación de facilitadores en el cultivo de plátano, bajo la metodología de escuelas de campo - ECA". INIAP Estación Experimental Portoviejo, FENAPROPE y ULEAM.

Corozo-Ayovi, R (16/09/2021). Charla Técnica. Manejo agronómico del cultivo de banano: Insectos plagas y nematodos. Dirigido a Técnicos de MAG.

Corozo-Ayovi, R (09/12/2021). Charla Técnica. Manejo integrado del trips de la mancha roja y el uso del aplicativo móvil MA\$ BANANO. Dirigido a productores y técnicos de banano orgánico de las Asociaciones ASOQUABO, ASOMUNUE y a técnicos de la Subsecretaría de Musáceas. Proyecto de Investigación “Escalando mejora continua en banano orgánico de exportación familiar”.

Peñaherrera, S. (16/08/2021). Expositora para técnicos del Ministerio de Agricultura y Ganadería. EET- Pichilingue. Charla teórica: Manejo integral de plagas y enfermedades de maíz y soya. INIAP.

Peñaherrera, S. (28/10/2021). Expositora para técnicos de la Escuela de semilleros de maíz. EE- Sto. Domingo de los Tsachilas. Charla teórica: Enfermedades que atacan al cultivo de maíz, daño y control. INIAP.

- Solis, K. (19/01/2021). Expositora en taller dirigido a productores de la Parroquia Las Villegas, GAD Cantonal de La Concordia con la temática: Identificación de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.
- Solis, K. (10-12/03/2021). Expositora en taller dirigido a productores de los cantones de Tonchigüe y Eloy Alfaro, provincia de Esmeraldas con la temática: Identificación de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.
- Solis, K. (07/07/2021). Expositora en charla dirigida a agricultoras de la Aso. AGROLINDA del proyecto Súper Mujer Rural, cantón El Empalme, provincia de Guayas con la temática: Manejo de enfermedades de cacao. INIAP.
- Solis, K. (30/07/2021). Expositora en charla dirigida a agricultores del cantón El Empalme (sector Las Cruces), provincia de Guayas con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.
- Solis, K. (12/08/2021). Expositora en charla dirigida a agricultores del cantón Valencia (Aso. El Señor de la Justicia), provincia de Los Ríos con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.
- Solis, K. (12/08/2021). Expositora en charla dirigida a agricultores del cantón Mocache (Aso. El Señor de la Justicia), provincia de Los Ríos con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.
- Solis, K. (16/08/2021). Expositora en charla dirigida a agricultores del cantón Mocache (Asociación San Antonio), provincia de Los Ríos con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.
- Solis, K. (19/08/2021). Expositora en charla dirigida a agricultores del cantón El Empalme (Aso. Comuna Cristóbal Colón), provincia de Guayas con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.
- Solis, K. (20/08/2021). Expositora en charla dirigida a agricultores del cantón Mocache (Asociación de agricultores ASOPROVALE), provincia de Los Ríos con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.
- Solis, K. (23/08/2021). Expositora en charla dirigida a agricultores del cantón Mocache (Asociación de agricultores Lechugal Medio), provincia de Los Ríos con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.
- Solis, K. (24/08/2021). Expositora en charla dirigida a profesores de Morona Santiago con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.
- Solis, K. (25/08/2021). Expositora en charla dirigida a agricultores del cantón Mocache (Asociación de agricultores Paraíso Escondido), provincia de Los Ríos con la

temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.

Solis, K. (27/08/2021). Expositora en charla dirigida a agricultores del cantón El Empalme (Asociación de agricultores Murucumba), provincia de Guayas con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.

Solis, K. (10/11/2021). Expositora en charla dirigida a productores de la Comuna Colorados del Búa de Santo Domingo de los Tsáchilas con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.

Solis, K. (18/11/2021). Expositora en charla dirigida a productores de Rcto. EL Rosario, La Represa con la temática: Reconocimiento y manejo de enfermedades en el cultivo de cacao. INIAP.

Vera, D. (24/08/2021). Expositor en charla técnica dirigida Agricultores cacaoteros del sector de Mocache, con la temática: Monitoreo de enfermedades en cacao

Vera, D. (06/09/2021). Expositor en charla técnica dirigida Agricultores plataneros de la localidad de El Carmen, Manabí con la temática: Principales enfermedades en plátano.

Vera, D. (16/09/2021). Participación en Mesa de diálogo sobre “Problemas de enfermedades en cacao (Líder de mesa).

Vera, D. (17/09/2021). Expositor en charla técnica dirigida técnicos del Ministerio de Agricultura, Quevedo, Los Ríos. Con la temática: Foc R4T en banano.

Vera, D. (20/10/2021). Expositor en charla técnica dirigida productores de banano, Guayaquil, Guayas. Con la temática: Biología, sintomatología y normativa de Foc R4T y Moko en banano en Ecuador.- Estrategias de prevención y contención en campo.

Vera, D. (28/10/2021). Expositor en charla técnica dirigida técnicos de MAG y agricultores de maíz. Estación Experimental Santo Domingo. productores de maíz, Santo Domingo, Santo Domingo de los Tsáchilas. Con la temática: Principales enfermedades en el cultivo de maíz”.

9.3. Asistencia a eventos en línea:

Corozo-Ayovi, R. (30/9/2021). Participación en la conferencia online “El control biológico en Panamá: actualidad, proyección y desafíos”. Organizado por la Organización Internacional para el Control Biológico - Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

Corozo-Ayovi, R. (20-22/10/2021). Participación en la conferencia online “LIQUENES: Historia, avances y perspectivas en Ecuador” Organizado por Instituto Nacional de Biodiversidad INABIO.

Corozo-Ayovi, R. (29/10/2021). Participación en la conferencia online “Control biológico aplicado en Venezuela: potencial y desafíos”. Organizado por la Organización Internacional para el Control Biológico - Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

6

Corozo-Ayovi, R. (25/11/2021). Participación en la conferencia online “Control biológico de plagas en plantaciones forestales en Brasil”. Organizado por la Organización Internacional para el Control Biológico - Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

Corozo-Ayovi, R. (16-28/11/2021). Participación en el curso online “Curso de Implementadores de medidas de bioseguridad para prevenir el ingreso de Foc R4T en lugares de producción de musáceas”. Organizado por la Agencia de Regulación Control Fito y Zoonosanitario AGROCALIDAD.

Corozo-Ayovi, R. (7/12/2021). Participación online en taller de trabajo del “Proyecto Cadenas Sostenible” cuyo objetivo general es “aumentar la sostenibilidad en la cadena de banano”. Organizado por la Cooperación Técnica Alemana GIZ.

Peñaherrera, S. (11-15/01/2021). Participación en el “Ciclo de Conferencias de Agronegocios” por la Universidad Técnica Particular de Loja.

Peñaherrera, S. (25-27/01/2021). Curso “Morfología y Fisiología del Cacao” modalidad virtual, por la empresa Bio Research S.A. y la Universidad Regional Amazónica Ikiam.

Peñaherrera, S. (11/02/2021). Participación en el Webinar titulado “Programas de Control Biológico en Brasil” por la Organización Internacional para el Control Biológico - Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

Peñaherrera, S. (15/02-01/03/10/2021). Curso E-learning: avances recientes en el estudio de hongos formadores de micorrizas y su aplicación como biofertilizantes en agroforestería, modalidad virtual. Período del 15 de febrero al 01 de marzo del 2021, por CEDIA; YACHAY. IKIAM y la ESPOL.

Peñaherrera, S. (24/03/2021). Participación en el Simposio Intensificación Sostenible de la Fruticultura Andina: Versión Perú por el Proyecto Productividad y Competitividad Frutícola Andina.

Peñaherrera, S. (14-16/04/2021). Curso “Métodos de recolecta y preservación de agentes de control biológico” por la Sociedad Multidisciplinaria en Ciencias Agronómicas Aplicadas y Biotecnología con el Centro de Estudios en Desarrollo Sustentable y Aprovechamiento de la Vida Silvestre de la Universidad Autónoma de Campeche con la participación del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

Peñaherrera, S. (15/04/2021). Participación en el Webinar titulado “Control Biológico de Malezas” por la Organización Internacional para el Control Biológico - Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

7

Peñaherrera, S. (23/04/2021). Participación en el Webinar titulado “Interacciones entre parasitoides oófagos de pentatómidos” por la Organización Internacional para el Control Biológico - Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

Peñaherrera, S. (27/04-27/05/2021). Participación en el curso virtual “Redacción y Publicación de Artículos Científicos” por el Instituto en Ciencias Computacionales de Reynosa (ITCC-México).

Peñaherrera, S. (3-7/05/2021). Participación en la capacitación virtual “Sistemas de Información Geográfica aplicada a la Agricultura” (Nivel Básico) por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

Peñaherrera, S. (12/05/2021). Participación en la conferencia online “El arte de dirigir en educación” por la Universidad Casa Grande.

Peñaherrera, S. (27/05/2021). Participación en la capacitación virtual sobre “Manejo Integrado de Plagas y Diversidad Genética en el cultivo de Pitahaya” dictado por Allpactiva.

Peñaherrera, S. (27/05/2021). Participación en el Webinar titulado “Estrategias do controle biológico no manejo integrado de pragas no Brasil” - Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

Peñaherrera, S. (06/06/2021). Capacitación virtual sobre: “Calibración de Equipos de Aplicación” dictado por Allpactiva

Peñaherrera, S. (08/06/2021). Taller Internacional “Estrategias de Bioseguridad para la prevención de *Fusarium* Raza 4 Tropical en Banano Orgánico de Exportación en Perú” por la Alianza Bioersity International – CIAT, SENASA e INIA

Peñaherrera, S. (10/06/2021). Participación en el seminario “Medición y Seguimiento de la Agricultura Sostenible” por la Universidad de Buenos Aires.

Peñaherrera, S. (16/06/2021). Participación en el Webinar “Geomática Aplicada para la reducción de riesgos naturales y Antrópicos” por el Instituto de Posgrado de la Universidad Técnica de Manabí.

Peñaherrera, S. (17/06/2021). Participación en la capacitación virtual sobre “Avances en la investigación en Cacao en la zona nor-occidental del Perú” dictado por Allpactiva.

Peñaherrera, S. (17/06/2021). Participación en el evento técnico virtual “Manejo integrado del cultivo de mango: Maduración de brotes e inducción floral” por el INIA.

Peñaherrera, S. (23-25/06/2021). Participación en el II Simposio Científico Internacional “Ciencia, Innovación y Desarrollo Sostenible” por el Instituto de Posgrado de la Universidad Técnica de Manabí.

Peñaherrera, S. (27/06/2021). Participación en el curso de “Implementadores de medidas de bioseguridad de medidas de bioseguridad para prevenir el ingreso de Foc R4T en lugares de producción de musáceas” por AGROCALIDAD.

Peñaherrera, S. (30/06/2021). Participación en el evento técnico virtual “Manejo integrado del cultivo de café: Variedades” por el INIA.

Peñaherrera, S. (30/06/2021). Participación en el Manejo integrado del cultivo de café: “Nutrición en el cultivo” organizado por la Estación Experimental Agraria El Chira del Instituto Nacional de Innovación Agraria de Piura.

Peñaherrera, S. (30/06/2021). Participación en la conferencia online “La Tecnología e Innovación como medio de reinención para la gestión del conocimiento en organizaciones” por la Universidad Casa Grande.

Peñaherrera, S. (30/06-1/07/2021). "IX Congreso Ecuatoriano de La Papa" por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

Peñaherrera, S. (22/07/2021). Participación en los Webinars titulados: "Evaluación de enemigos naturales de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz) en Valle Bajo, Valle Alto, Mizque y Aiquile” y "Evaluación de enemigos naturales relacionadas a plagas de cultivos anuales en el Departamento de Santa Cruz".

Peñaherrera, S. (27-29/07/2021). Certificate of attendance for participation in the FAO's Conference Strengthening capacities and awareness on the *Fusarium* TR4's.

Peñaherrera, S. (23-27/08/2021). Semana de la Agroecología: “Agricultura ecológica y sostenible, situación y retos” por la Universidad Regional Amazónica Ikiam.

Peñaherrera, S. (24-26/08/2021). Taller para la “redacción y publicación de artículos científicos y de revisión” por el Instituto de Posgrado de la Universidad Técnica de Manabí.

Peñaherrera, S. (25/08/2021). Participación en la conferencia online Banano alimento esencial: “Tendencias de consumo, nuevos mercados y comercialización” por CORBANA.

Peñaherrera, S. (26/08/2021). Participación en la capacitación virtual sobre: “Intoxicación por Plaguicidas de uso Agrícola” dictado por Allpactiva.

Peñaherrera, S. (27/08-01/09/2021). Participación en la capacitación virtual "Manejo Técnico del cultivo de yuca" por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

Peñaherrera, S. (08/09/2021). Participación en el Webinar titulado “Bioprospección de parasitoides de huevos y larvas para el manejo de plagas lepidópteras en cultivos Bt” Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

Peñaherrera, S. (08-09/09/2021). Seminario online “Arañitas Rojas” por el Instituto ENTOMA.

Peñaherrera, S. (16/09/2021). Participación en el Webinar titulado “Control biológico de lepidópteros: desafío y potencial” Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

Peñaherrera, S. (30/09/2021). Webinar titulado “El control biológico en Panamá: actualidad, proyección y desafíos” Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

Peñaherrera, S. (19-21/10/2021). Simposio de Agroecología, Seguridad Alimentaria y Sostenibilidad por TRIAS, KOPIA, INIAP y la ESPOCH.

Peñaherrera, S. (22/10/2021). Capacitación virtual sobre “Bases para el Manejo Seguro de Fungicidas” dictado por Allpactiva.

Peñaherrera, S. (04/11/2021). Webinar “Biología, sintomatología, y normativa de *Fusarium* Raza 4 Tropical y Moko en los cultivos de Banano y Plátano” por YARA e INIAP.

Peñaherrera, S. (10/11/2021). Participación en el Seminario virtual de Papa 2021 por YARA e INIAP.

Peñaherrera, S. (25/11/2021). Participación en el Webinar titulado “Control biológico de plagas en plantaciones forestales de Brasil” Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).

Peñaherrera, S. (30/11-03/12/2021). Participación XIII Simposio Internacional de Recursos Genéticos para las Américas y el Caribe SIRGEAC 2021.

- Peñaherrera, S. (16/12/2021). Participación en el Webinar titulado “Produção e preservação ambiental - Sustentabilidade do Agro Brasileiro” Sección Regional Neotropical (IOBC NTRS).
- Solis, H. K. (03/02/2021). Participación en la conferencia online de 1 hora y 30 minutos: “De la presenciabilidad a la virtualidad: Comprensión de los procesos de interacción en Educación online”. Dictado por: Antonio Quintas. Posgrados, Universidad Casa Grande.
- Solis, H. K. (10/02/2021). Participación en la conferencia online de 1 hora y 30 minutos: “El método de casos en ambientes virtuales de aprendizaje”. Dictado por: Dolores zambrano e Ivan Vega. Posgrados, Universidad Casa Grande.
- Solis, H. K. (19/03/2021). Participación en “Taller de enfermedades del cacao”, con una duración de 8 horas pedagógicas. Gobierno Provincial de Santo Domingo de los Tsáchilas.
- Solis, H. K. (05-07/04/2021). Participación en webinar titulado “Interacciones entre parasitorides oófagos de pentatómidos”. Organizado por IOBC-NTRS, dictado por Dra. M. Fernanda Cingolani (CEPAVE, Argentina).
- Solis, H. K. (05-07/04/2021). Participación en la Jornada Académica de Empoderamiento de los Derechos de la Mujer, con una duración de 12 horas pedagógicas. Gobierno Provincial de Santo Domingo de los Tsáchilas.
- Solis, H. K. (14-15/04/2021). Participación en “Taller Primeros Auxilios psicológicos”, con una duración de 12 horas pedagógicas. Gobierno Provincial de Santo Domingo de los Tsáchilas.
- Solis, H. K. (21/04/2021). Participación en la conferencia online de 2 horas: “Estrategias de marketing educativo”. Dictado por: Gary Pulla. Posgrados, Universidad Casa Grande.
- Solis, H. K. (23/04/2021). Participación en webinar titulado “Interacciones entre parasitorides oófagos de pentatómidos”. Organizado por IOBC-NTRS, dictado por Dra. M. Fernanda Cingolani (CEPAVE, Argentina).
- Solis, H. K. (19/05/2021). Participación en la conferencia online de 2 horas: “Descriptive writing facilitated by blogs”. Dictado por: Alvaro Robles. Posgrados, Universidad Casa Grande.
- Solis, H. K. (22/05/2021). Participación en webinar de 2 horas: “Ranking Web de Universidades del Mundo”. Realizado por la Maestría Bibliotecología, Mención Gestión de la Información. Universidad Técnica de Manabí.
- Solis, H. K. (08/06/2021). Participación en Taller Internacional “Estrategias de bioseguridad para la prevención de *Fusarium* raza 4 tropical en banano

orgánico de exportación en Perú”, con una duración de 4 horas lectivas.
Alianza Bioversity International-CIAT, SENASA e INIA.

Solis, H. K. (16/06/2021). Participación en la conferencia online de 2 horas:
Comprendiendo “las dis” en el aula: dislexia, discalculia, disgrafía, disortografía.
Dictado por: María José Valencia. Posgrados, Universidad Casa Grande.

Solis, H. K. (19-21/06/2021). Participación en “Taller de Violencia intrafamiliar y de
género”, con una duración de 8 horas pedagógicas. Gobierno Provincial de
Santo Domingo de los Tsáchilas.

11

Solis, H. K. (22/06/2021). Participación en webinarios titulados “Evaluación de
enemigos naturales de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz) en
Valle Bajo, Valle Alto, Mizque y Aiquile” y “Evaluación de enemigos naturales
relacionadas a plagas de cultivos anuales en el Departamento de Santa Cruz”.
Organizado por IOBC-NTRS, dictado por Ing. Jorge Luis Crespo (PROINPA –
Bolivia) y MSc. Gabriela Rivadeneira (CIAT – Bolivia).

Solis, H. K. (02/08/2021). Participación en la conferencia online de 2 horas: “El impacto
de las relaciones, no solo públicas”. Dictado por: Laura Moyano y Mariana
Garavaglia. Posgrados, Universidad Casa Grande.

Solis, H. K. (1/09/2021). Participación en la conferencia online de 2 horas: “La
necesidad de profesorado investigador: Razones para una maestría en
educación”. Dictado por: Dr. Antonio Navío. Posgrados, Universidad Casa
Grande.

Solis, H. K. (7/09/2021). Participación en la conferencia online de 2 horas:
“Planificación estratégica para una educación de calidad”. Dictado por: Mgst.
Olga Saltos. Posgrados, Universidad Casa Grande.

Solis, H. K. (16/09/2021). Participación en webinar titulado “Control biológico de
lepidópteros: desadío e potencial”. Organizado por IOBC-NTRS, dictado por Dr.
Iván Cruz (EMBRAPA, Brasil).

Solis, H. K. (25-29/10/2021). Participación en curso de capacitación virtual
“Ciberseguro – INIAP”, con una duración de 2 horas, INIAP.

Solis, H. K. (29/10/2021). Participación en webinar titulado “Control biológico aplicado
en Venezuela: potencial y desafíos”. Organizado por IOBC-NTRS, dictado por
Lic. Biol. Alexander Acosta (Sophos Biocontrol, Venezuela).

Solis, H. K. (04/11/2021). Participación en webinar titulado “Biología, sintomatología y
normativa de Fusarium Raza 4 tropical y Moko en los cultivos de banano y
plátano”. Organizado por Yara e INIAP.

9.4. Reuniones en las que participaron los técnicos durante el 2021:

Solis, K. (21/01/2021). Convocatoria a Reunión de Comité Técnico, Memorando Nro. INIAP-EETP_DIR-2021-0046-MEM, con la finalidad de revisar el Informe Técnico Anual 2020 del Programa de Maíz. Comunicación N^a INIAP-EETP_PM-2020-0097-MEM.

Solis, K. (26/01/2021). Convocatoria a Reunión de Comité Técnico, Memorando Nro. INIAP-EETP_DIR-2021-0064-MEM, con la finalidad de revisar el Informe Técnico Anual 2020 del Programa de Cacao y Café. Comunicación N^a INIAP-EETP_PNCF-2021-0002-MEM.

12

Solis, K., Peñaherrera, S., (12/02/2021). Reunión virtual a través de Google Meet, sobre Comité de Publicaciones, Revisión Guía Enfermedades Cacao GIZ.

Solis, K. (22/02/2021). Convocatoria a Reunión de Comité Técnico, Memorando Nro. INIAP-EESD_DIR-2021-0166-MEM, con la finalidad de revisar las observaciones realizadas al documento “Protocolo para el desarrollo de biopesticidas para control de garrapatas mediante hongos entomopatógenos, presentado” por el Mgs. David Hidalgo.

Solis, K. (24/02/2021). Convocatoria a Reunión de Comité Técnico, Memorando Nro. INIAP-EETP_DIR-2021-0139-MEM, con la finalidad de revisar el Informe Técnico Anual 2020 del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas. Comunicación N^a INIAP-EETP_DNMSA-2021-0002-MEM.

Solis, K. (14/04/2021). Convocatoria a Reunión de Comité Técnico, Memorando Nro. INIAP-EETP_DIR-2021-0357-MEM, con la finalidad de revisar las correcciones sugeridas mediante Acta de Comité Técnico N^o 006 CT-EETP-2021 al Informe Técnico Anual 2020 del Programa de Cacao y Café. Comunicación N^a INIAP-EETP_PNCF-2021-0002-MEM.

Solis, K., Peñaherrera, S., (03/06/2021). Reunión de trabajo en la Sala de Sesiones de la EETP, resultados preliminares obtenidos con ensayo de control biológico para FOC R1 en banano, además se discutió el plan de capacitación a presentarse en la reunión con los bananeros.

Solis, K. (17/06/2021). Convocatoria a Reunión de Comité Técnico, Memorando Nro. INIAP-EETP_DIR-2021-0853-MEM, con la finalidad de revisar el proyecto “Presencia de Cd y Pb total y disponible en productos minerales y orgánicos utilizados en la nutrición de cultivos en Ecuador”. Comunicación N^a INIAP-EETP_DNMSA-2021-0052-MEM.

Solis, K., Vera, D. (20/07/2021). Reunión de trabajo para la revisión de Protocolos de investigación, Estación Experimental Litoral Sur. Guayas.

Solis, K. (02/08/2021). Convocatoria a Reunión de Comité Técnico, Memorando Nro. INIAP-EETP_DIR-2021-1167-MEM, con la finalidad de revisar el informe

técnico final de validación de cultivares “COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO, PRODUCTIVO Y SANITARIO DE CINCO HÍBRIDOS DE MAÍZ COMPARADOS CON CUATRO HÍBRIDOS COMERCIALES, EN OCHO LOCALIDADES DEL TERRITORIO ECUATORIANO DURANTE LA ÉPOCA LLUVIOSA 2020”, correspondiente al Contrato de Servicios firmado entre INIAP-DUPONT S.A. Comunicación N° INIAP-EETP_DPVBSA-2021-00258-MEM.

Solis, K. (10/08/2021). Convocatoria a Reunión de Comité Técnico, Memorando Nro. INIAP-EETP_DIR-2021-1186-MEM, con la finalidad de revisar el informe técnico final de validación de cultivares “COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO, PRODUCTIVO Y SANITARIO DE TRES HÍBRIDOS DE MAÍZ COMPARADOS CON CUATRO HÍBRIDOS COMERCIALES, EN SIETE LOCALIDADES DURANTE LA ÉPOCA LLUVIOSA Y SECA 2020”, correspondiente al Contrato de Servicios firmado entre INIAP-DUPONT S.A. Comunicación N° INIAP-EETP_DPVBSA-2021-00266-MEM.

13

Solis, K. (01/09/2021). Convocatoria a Reunión de Comité Técnico, Memorando Nro. INIAP-EETP_DIR-2021-1302-MEM, con la finalidad de revisar el informe técnico final de validación de cultivares “COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO, PRODUCTIVO Y SANITARIO DE TRES HÍBRIDOS DE MAÍZ COMPARADOS CON CUATRO HÍBRIDOS COMERCIALES, EN SIETE LOCALIDADES DURANTE LA ÉPOCA LLUVIOSA Y SECA 2020”. Comunicación N° INIAP-EETP_DPVBSA-2021-00296-MEM.

Solis, K. (27/10/2021). Convocatoria a Reunión de Comité Técnico, Memorando Nro. INIAP-EETP_DIR-2021-1566-MEM, con la finalidad de revisar el Anexo Técnico No. 1: "Proyecto Específico de Cooperación entre el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y el Proyecto MOCCA". Comunicación N° INIAP-EETP_PNC-2021-0057-MEM.

Solis, K. (06/12/2021). Reunión con delegación de la FENOCIN durante visita realizada a la EET-Pichilingue.

Solis, K. (15/12/2021). Participar en “Taller de evaluación INIAP 2021”, Memorando Nro. INIAP-INIAP-2021-0325-MEM. Estación Experimental Santa Catalina, Mejía, Pichincha.

Vera, D. (14/01/2021). Participar en reunión con responsable de producción para revisar los costos de implementación del servicio de nematodos en la EETP. Estación Experimental Tropical Pichilingue. Mocache, Los Ríos.

9.5. Visitas realizadas a empresas, haciendas y fincas durante el 2021:

Solis, K. (15/07/2021). Visita a los laboratorios de EE-Santo Domingo (La Concordia) y finca bananera orgánica del Ing. Fausto Figueroa (Quinindé) junto al Subsecretario de Musáceas (Ing. Eduardo Izaguirre). Santo Domingo.

Solis, K. Vera, D. (18/07/2021). Visita a la EE-Portoviejo y recorrido de los laboratorios donde se podría realizar la multiplicación de los agentes de control biológico para el rubro Musáceas, Portoviejo.

Solis, K. Vera, D. (14/09/2021). Visita a bananera orgánica para realizar la primera aplicación de *Trichoderma* spp., en la parcela demostrativa (1 ha) instalada en propiedad de Ing. Fausto Figueroa, recinto El Rocío, parroquia La Unión. Quinindé.

14

Solis, K. (17/09/2021). Visita a bananera convencional para realizar la primera aplicación de *Trichoderma* spp., en la parcela demostrativa (1 ha) instalada en propiedad de Ing. Narcisa Calderón, Finca La Arteaga, cantón Mocache.

Solis, K. (21/10/2021). Visita a bananera convencional para realizar la segunda aplicación de *Trichoderma* spp., en la parcela demostrativa (1 ha) instalada en propiedad de Ing. Narcisa Calderón, Finca La Arteaga, cantón Mocache.

Solis, K. (22/10/2021). Visita a bananera orgánica para realizar la segunda aplicación de *Trichoderma* spp., en la parcela demostrativa (1 ha) instalada en propiedad de Ing. Fausto Figueroa, recinto El Rocío, parroquia La Unión. Quinindé.

Solis, K. (09/12/2021). Visita a bananera convencional para realizar la tercera aplicación de *Trichoderma* spp., en la parcela demostrativa (1 ha) instalada en propiedad de Ing. Narcisa Calderón, Finca La Arteaga, cantón Mocache.

10. Propuestas presentadas:

Propuesta 1.

Título: Análisis fitopatológico/entomológicos a muestras vegetales en el laboratorio de Fitopatología de la EET Pichilingue.

Tipo propuesta: Proyecto de producción.

Fondos o Convocatoria: EET-Pichilingue, INIAP.

Fecha presentación: Enero 1980.

Responsable: Mgs. Sofia Peñaherrera (laboratorio de Fitopatología)
Mgs. Elena Corozo (laboratorio de Entomología).

Equipo multidisciplinario: Dra. Karina Solis, Ph.D. Danilo Vera, MSc. Edwin Borja.

Presupuesto: \$ 1500,00

Duración proyecto: Indefinido.

Estado: Continuidad

Fecha probable de inicio: Enero 1980.

Propuesta 2.

Título: Efecto de fungicidas químicos y bioestimulantes sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* raza 1 a nivel de laboratorio e invernadero.

Tipo propuesta: Proyecto de investigación.

Fondos o Convocatoria: No determinado

Fecha presentación: Octubre 2020.

Responsable: Ph.D. Danilo Vera, Ing. Daniel Pisco

Equipo multidisciplinario: Dra. Karina Solís, Mgs. Sofia Peñaherrera-DPV-EETP
MSc. Iván Garzón- Dpto. Biotecnología-EETP.
Dr. José Ochoa-DPV (EESC)
Presupuesto: \$ 1500,00
Duración proyecto: 12 meses.
Estado: Presentado a Comité Técnico.
Fecha probable de inicio: Julio, 2021.

Propuesta 3.

Título: Uso de la fauna benéfica asociada en banano, arroz, maíz y cacao como potenciales controladores biológicos de los insectos plaga en el litoral ecuatoriano
Tipo propuesta: Proyecto de investigación.
Fondos o Convocatoria: FIASA
Fecha presentación: Diciembre 2021
Responsable: Ph.D. Danilo Vera
Equipo multidisciplinario: Mgs. Elena Corozo (Entomología), Dra. Karina Solís, Mgs. Sofía Peñaherrera (Fitopatología)
Presupuesto: \$ 120000
Duración proyecto: 4 años
Estado: Presentado a comité técnico para considerarse en FIASA
Fecha probable de inicio: Marzo, 2022

15

11. Hitos/Actividades por proyecto ejecutadas por el programa o departamento

Actividad 1: Análisis Fitopatológico/Entomológicos a muestras vegetales en el Laboratorio de Fitopatología de la EET Pichilingue

Responsable: Mgs. Sofía Peñaherrera.
Mgs. Elena Corozo

Colaboradores: Ph.D. Danilo Vera, Dra. Karina Solís.

Antecedentes:

La identificación correcta y oportuna de los organismos nocivos y sus controladores naturales es la herramienta básica que deben tener los productores para diseñar estrategias adecuadas de manejo integrado. Muchos problemas fitosanitarios a los que están expuestos los cultivos tropicales del Ecuador se agravan porque los agricultores no conocen exactamente cuál es el agente causal o si en sus campos se encuentran reguladores naturales que están reduciendo poblaciones de plagas, es por eso que el Departamento de Protección Vegetal (DPV) de la Estación Experimental Tropical Pichilingue brinda el servicio de identificación de problemas fitosanitarios y organismos benéficos para los productores agrícolas de su zona de influencia.

Objetivo:

Brindar servicio de diagnóstico de problemas fitosanitarios presentes y determinar el agente causal en las muestras procesadas.

Metodología:

En el análisis de muestras se realizaron las siguientes actividades:

- ✓ Recepción de muestras
- ✓ Procesamiento de las muestras
- ✓ Aislamiento del/los agentes causales
- ✓ Purificación
- ✓ Identificación
- ✓ Elaboración del Informe (resultados y recomendaciones)
- ✓ Envío de resultados por vía electrónica

16

Durante los meses de enero a diciembre del 2021, en el laboratorio de Fitopatología, se receptaron muestras de tejidos de los principales cultivos de importancia económica procedentes de los cantones Quevedo, El Empalme, Buena Fe, Ventanas, La Maná, Portoviejo, entre otros.

Una vez ingresadas las muestras se sometieron a dos tipos de observaciones (*in vivo* e *in vitro*). La revisión *in vivo* consistió en observar el crecimiento micelial directamente sobre el tejido afectado, para esto se colocó la muestra en una cámara húmeda (muestra colocada en el interior de un recipiente plástico cerrado herméticamente y provisto de humedad en papel toalla). Se revisó cada 24 horas y cuando aparecieron signos de los hongos se realizó una tinción, con un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas. Una vez preparado el colorante, se colocó la muestra en un portaobjetos por medio de una impronta (proceso en el cual se toma una impresión de la muestra sobre una estructura, utilizando una cinta adhesiva transparente) y se observó al microscopio (Barnett y Hunter, 1998).

Para la observación *in vitro* se cortó el tejido afectado, en pequeñas secciones de aproximadamente 1 cm y se lavaron con hipoclorito (al 10% para tejido leñoso y al 5% para tejido vegetativo o frutos) por 2 minutos, luego se realizó un proceso de tres enjuagues con agua destilada estéril y se colocaron en papel toalla estéril hasta que el agua fue absorbida, seguidamente con una asa recta estéril se distribuyeron cinco secciones por plato Petri conteniendo medio de cultivo para hongos como Papa Dextrosa Agar (PDA, marca DIFCO®) o para bacterias Agar Nutriente (AN), posteriormente se incubó a 24°C durante cuatro días para permitir el crecimiento de estructuras fructíferas, que se observaron al microscopio y se identificaron con la ayuda de claves taxonómicas específicas, luego se revisó literatura especializada para concluir con el diagnóstico y su respectivo informe, donde se indicaron las recomendaciones a seguir para el manejo de la enfermedad.

El análisis de la carga microbiana, se realizó mediante la técnica de dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) en tubo de ensayo y vertido en placa de Petri, utilizando medio de cultivo PDA. Se preparó la suspensión madre de la muestra, con 1 g (sustrato) o 1ml (líquido), que se suspende en 9 ml de agua destilada estéril (suspensión madre), se homogeniza en agitador tipo vortex, de esta se toma 1 ml que se coloca en 9 ml de agua destilada estéril (suspensión 10^{-1}) y así sucesivamente se repite con las

siguientes suspensiones, para finalmente de cada una tomar 1 ml y añadirlo en 9 ml de PDA, homogenizarlo y verterlo en la placa Petri. Se incuba durante dos días en el caso de bacterias y siete días para hongos filamentosos cultivables, se observa y contabiliza la formación de colonias en la superficie del medio.

Para las muestras que ingresan con requerimiento de análisis entomológico, se realizó la observación del comportamiento del insecto, daños realizados en el material vegetal de procedencia y se mantuvo confinado en condiciones adecuadas para documentar imágenes fotográficas de su morfología en los diferentes estados de desarrollo. Esto con la finalidad de obtener el insecto adulto para realizar la identificación con el apoyo de claves dicotómicas y consulta de material bibliográfico.

17

Las muestras de raíces para análisis de nematodos, después de ser lavadas para retirar el exceso de suelo, son procesadas por método de licuado-tamizado, los nematodos extraídos de las raíces son observados en un microscopio invertido, identificados y contabilizados para representar los valores en 100 g de raíces.

Resultados:

En los análisis fitopatológicos que se realizaron durante el 2021 encontramos el 85% de cultivos y el 35% para carga microbiana. De enero a diciembre, se realizaron 85 análisis fitosanitarios en los cultivos de cacao, melina, balsa, mango, eucalipto, jengibre, semilla de algodón, teca, guanábana, tabaco, vainilla, banano, maíz y pitahaya. (Cuadro 1) El análisis de carga microbiana se realizó a sustrato, agua y productos biológicos (Figura 1).

En el laboratorio de Entomología entre noviembre a diciembre, se realizaron 16 análisis de identificación (Cuadro 2), de los cuales el 87,5% de estas tuvieron requerimiento nematológico en los cultivos de banano, maíz, cacao y balsa.

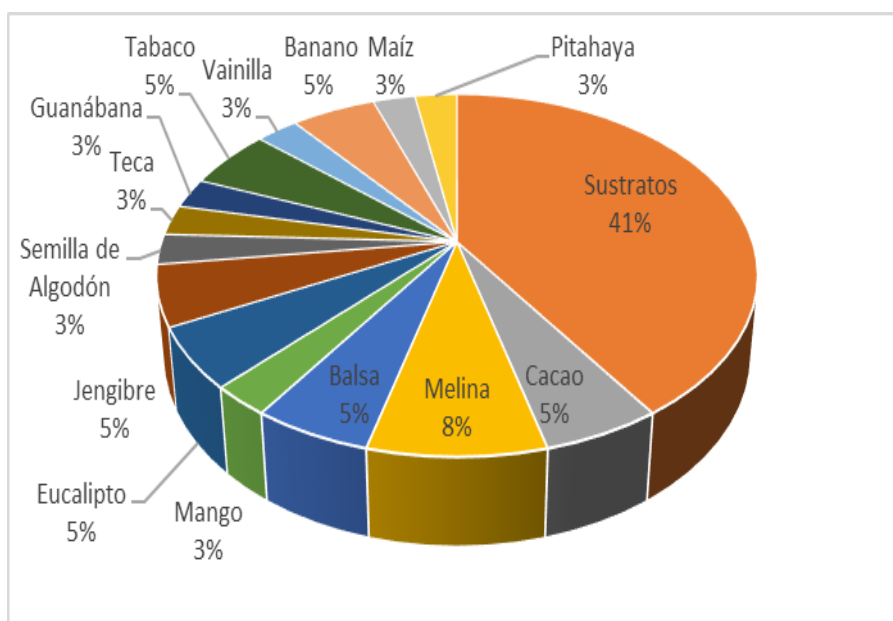


Figura 1. Porcentaje de los principales cultivos afectados o muestras analizadas procesadas en el Laboratorio durante el 2021.

El mayor número de organismos identificados en el laboratorio de Fitopatología del Dpto. de Protección Vegetal, indistintamente del cultivo hospedero, fueron los géneros de los hongos *Lasiodiplodia*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Cuadro 1).

Adicionalmente, en los cultivos de maíz de la EETP, el personal del laboratorio de Entomología desde el 25 de septiembre del 2021 realizó recolectas de diferentes estados de desarrollo del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith) para establecer en condiciones de laboratorio el pie de cría y mantener la colonia con la dieta merídica de Greene modificada (Arévalo y Zenner, 2009). Hasta diciembre del 2021 se obtuvieron 2 generaciones de *S. frugiperda*. En las recolectas de campo se logró confinar el parasitoide de huevecillos *Telenomus remus* Nixon, el cual es un controlador biológico de *S. frugiperda* las larvas de esta plaga mantiene la colonia de este insecto benéfico en condiciones de laboratorio.

Cuadro 1. Número de muestras ingresadas al laboratorio de Fitopatología durante el 2021

No. de muestras	Cultivo	Tipo de análisis	Localidad	Síntomas	Diagnóstico
1	Sustrato	Carga microbiana	Quevedo	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y vertido en placa Petri con PDA.	Transcurridos 6 días de efectuada la dilución seriada, no se observó el crecimiento de colonias.
6	Suero de Leche	Carga microbiana	Quito	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y vertido en placa Petri con PDA.	Bacterias $1,26 \times 10^7$, $8,7 \times 10^6$, $1,24 \times 10^3$, $7,9 \times 10^2$, $1,07 \times 10^7$, $9,7 \times 10^2$ Hongos 0
3	Cacao	Fitopatológico	Los Bancos	Mazorcas (3) de color negro, cubiertas de carbón (polvo de color negro). Mazorcas (2) con mancha de color café oscuro y borde irregular. Mazorcas (3) con monilla, presencia de carbón y manchas de color café oscuro.	Mazorca 1: <i>Lasiodiplodia theobromae</i> Mazorca 2: <i>Colletotrichum</i> sp., <i>L. theobromae</i> , <i>Fusarium</i> sp. Mazorca 3: <i>Moniliophthora roreri</i> , <i>Colletotrichum</i> sp.
8	Sustrato - Planta	Carga microbiana	Las Palmas	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y vertido en placa Petri con PDA.	Mini Jardín 1: <i>Penicillium</i> sp., Mini Jardín 2: <i>Penicillium</i> sp., Mini Jardín 3: <i>Rhizopus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., Enraizamiento: <i>Trichoderma</i> sp., Pre Acimatización: <i>Trichoderma</i> sp., Acimatización: <i>Trichoderma</i> sp., Patio Luz: <i>Trichoderma</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., Patio Luz: (Sustrato) nada.
2	Sustrato	Carga microbiana	Quito	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y vertido en placa Petri con PDA.	M8 "Nuevo" <i>Trichoderma</i> sp., M9 "Enraizamiento" <i>Rhizopus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.
3	Tallo de Melina	Fitopatológico	El Vergel	M1: Planta con poco sistema radicular, al realizar corte transversal se observó necrosis desde el cuello hasta el sistema radicular. M2: Tronco con coloración oscura en la parte interna del cuello, la muestra presentaba escaso sistema radicular. M3: Tronco con coloración oscura en la parte interna del cuello, escaso sistema radicular.	M1 - M2: <i>Lasiodiplodia</i> sp. M3: <i>Fusarium</i> sp.
1	Tallo de Balsa	Fitopatológico	La Maná	Tronco con pequeños orificios causados por insectos, la muestra presentaba escaso sistema radicular. En la parte interna del cuello se observó una lesión de coloración oscura, esta avanzaba de forma ascendente.	<i>Lasiodiplodia</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp.

Continua...

5	Sustrato	Carga microbiana	El Vergel	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y vertido en placa Petri con PDA.	M1: <i>Aspergillus</i> sp., M2: <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., M3: <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., M4 Área 3: <i>Trichoderma</i> sp., M5 Área 3: <i>Trichoderma</i> sp.
1	Hojas de Eucalipto	Fitopatológico	La Esperanza	Hojas con pequeñas manchas de forma circular, las lesiones presentaban áreas hundidas las cuales causaban un arrugamiento precoz.	<i>Colletotrichum</i> sp.
1	Hojas de Mango	Fitopatológico	Sta. Elena	Hojas con manchas alargadas, las lesiones se presentaban desde el ápice de la hoja, que terminaban en necrosis en los bordes y abarquillando la hoja.	<i>Colletotrichum</i> sp. Se observó un efecto lupa debido alguna aplicación y posterior quemadura de sol.
4	Sustrato	Carga microbiana	Quevedo	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y vertido en placa Petri con PDA.	Muestra T2Th: Nada, Muestra T1Th <i>Trichoderma</i> sp., Muestra de Suelo No.1 <i>Trichoderma</i> sp.
8	Suero de Leche	Carga microbiana	Quito	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y vertido en placa Petri con PDA.	Bacterias $7,70 \times 10^6$, $7,60 \times 10^6$, $9,00 \times 10^2$, $2,70 \times 10^7$, $3,65 \times 10^3$, $1,45 \times 10^3$ Hongos 0
4	Planta de Eucalipto	Fitopatológico	La Maná	Hojas con pequeñas manchas de forma circular, las lesiones presentaban un leve arrugamiento.	<i>Colletotrichum</i> sp.
1	Hojas de Jengibre	Fitopatológico	La Maná	Hojas con pequeñas manchas de forma circular con borde irregular y dispersas en el haz.	<i>Colletotrichum</i> sp.
2	Semilla de Algodón - Suelo	Carga microbiana	EET-Portoviejo	En semilla de algodón se realizó aislamiento en medio de cultivo PDA en placa de Petri, se incubó a temperatura ambiente. Se realizó la determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y vertido en placa Petri con PDA.	De cultivo <i>in vitro</i> de semilla, se obtuvo colonias de <i>Trichoderma</i> sp. Transcurridos 6 días de efectuada la dilución seriada en la (10^{-2}) se obtuvo crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp.
6	Suelo	Carga Microbiana	INIAP	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y vertido en placa Petri con PDA.	M1: <i>Trichoderma</i> , Sustrato 7 y Testigo 6: Nada, M2: <i>T. harzianum</i> , M3: <i>T. asperellum</i> , M4: <i>Trichoderma</i> spp., M5: <i>T. virens</i> , M6
1	Ramas de Cacao	Fitopatológico	Ventanas	Follaje con tonalidad amarillenta y leve necrosis en bordes, las hojas no se desprendían con facilidad. Ramas terminales muertas, con la aparición de "puntas desnudas", al revisar la parte de interna se observó coloración café oscura.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.

2	Sustrato	Carga Microbiana	Quito	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$) y vertido en placa Petri con PDA.	M1: Sustrato estéril Bacterias $3,80 \times 10^4$ Hongos $1,22 \times 10^5$ M2: Sustrato Bacterias $7,5 \times 10^4$ Hongos $1,01 \times 10^5$
2	Plántulas de Melina	Fitopatológico	Quito	M1: Plántulas con escasos pelos absorbentes, la raíz principal presentaba coloración café oscura, el follaje presentaba en los bordes leve necrosamiento. M2: Plántulas marchitas.	M1: <i>Fusarium</i> sp., además se obtuvo crecimiento de un micelio oscuro. M2: <i>Fusarium</i> sp.
1	Fragmento de Tronco de Teca	Fitopatológico	Buena Fe	Fragmento de tronco con cáncer, al realizar corte longitudinal se observó que la necrosis comprometía parte interna del cambium, de coloración café claro.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
1	Tronco de cacao	Fitopatológico	Balzar	Tronco con cancro en el cuello de la planta, la parte interna presentaba coloración café rojiza con borde irregular.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
1	Planta de Guanábana	Fitopatológico	Patricia Pilar	Hojas con manchas necróticas de forma alargadas, estas estaban distribuidas en el ápice.	<i>Colletotrichum</i> sp.
1	Planta de Tabaco	Fitopatológico	Buena Fe	Hojas con lesiones café oscuro a lo largo de las venas en el envés de las hojas. Se observó leve hundimiento en el tallo de coloración café.	<i>Colletotrichum</i> sp.
1	Planta de Tabaco	Fitopatológico	Quevedo	Planta de tabaco, la cual presentaba follaje con marchitez y necrosis en la parte del tallo.	<i>Fusarium</i> sp.
1	Planta de Vainilla	Fitopatológico	Patricia Pilar	Tallo con mancha de forma ovalada hundida de color café-marrón.	<i>Colletotrichum</i> sp.
1	Agua de río	Carga Microbiana	Quinsaloma	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$) y vertido en placa Petri con PDA.	Bacterias $1,36 \times 10^5$ Hongos 0
1	Hojas de Banano	Fitopatológico	Mocache	En el haz de la hoja se observó áreas con una coloración café claro, estas tenían apariencia de escaldadura.	No se observó crecimiento de hongos o bacterias.
1	Plántula de Williams	Fitopatológico	Ricaurte	Después de realizar revisión completa de plántulas, se constató un retardo y en algunos casos la no emergencia de la hoja bandera, Al realizar corte transversal en el pseudotallo se observó necrosis de tejido de coloración marrón en algunas secciones de las yaguas. En el cormo se observó un círculo de color marrón a negro que separaba la zona central de la zona en donde se forman las raíces.	Se observó crecimiento de una bacteria, se realizó Tinción de Rhyu y se determinó como tipo Gram negativa (-).

1	Planta de Jengibre y Suelo	Fitopatológico Carga Microbiana	Quevedo	Tallo clorótico, hojas con bordes necrosados leve amarillamiento, al revisar el rizoma no se observó daño por insecto, buen sistema radicular. Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$) y vertido en placa Petri con PDA.	<i>Fusarium</i> sp. Transcurridos 6 días de la muestra suelo, en 10^{-2} se identificó <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp.
1	Planta de Maíz	Fitopatológico	Quevedo	Lesiones angulares de color marrón oscuro con un halo amarillo, distribuidas a lo largo de las hojas.	<i>Alternaria</i> sp.
4	Tronco de Melina	Fitopatológico	Esmeraldas	M1 - M2: Raíz con coloración café oscura la cual avanzaba de forma ascendente, al realizar corte longitudinal se observó que la coloración oscura comprometía parte interna del cambium. M3 - M4: Tallo con coloración café y bordes irregulares de tonalidad rojiza, esta avanzaba de forma ascendente.	M1 - M2: <i>Fusarium</i> sp. M3 - M4: <i>Fusarium</i> sp.
1	Suelo de Palmito	Carga Microbiana	Quito	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$) y vertido en placa Petri con PDA.	<i>Trichoderma</i> sp.
1	Planta de Cacao	Fitopatológico	El Vergel	Clorosis y necrosis en cuello. En las raíces, se observó debajo de la corteza, un micelio de color blanco en forma de abanico. La raíz principal mostro estrangulamiento (cuello de cisne)	<i>Rosellinia</i> sp.
2	Productos Biológicos	Carga Microbiana	Balzar	Determinación de la carga microbiana mediante dilución seriada ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$) y vertido en placa Petri con PDA.	CRIBAC bacterias 0, hongos 0, Micos Plag WP bacterias 0, hongos $3,00 \times 10^6$.
1	Cacao	Fitopatológico	Cuatro Mangas	Leve amarillamiento en el follaje y ciertas áreas con necrosis. En las raíces se observó crecimiento de micelio en forma de abanico debajo de la corteza. Estrangulamiento por crecimiento cuello de cisne.	En cultivo in vitro se aisló <i>Lasiodiplodia</i> sp. En observaciones de la muestra se identificó <i>Rosellinea</i> sp.
3	Pitahaya	Fitopatológico	Vincés	M1: Cladodios (pencas) con pequeñas áreas amarillas. M2: En el pedúnculo del fruto se observó coloración oscura, no presentaba maceración. M3: Cladodios con amarillamiento en el ápice, se observó coloración de tono café claro la cual se tornaba oscura.	<i>Chalaropsis</i> sp.
1	Balsa	Fitopatológico	Quinindé	Tallo con pequeños orificios causados por insectos, la muestra presentaba escaso sistema radicular. En la parte interna del cuello se observó una lesión de coloración oscura, esta avanzaba de forma ascendente.	<i>Lasiodiplodia</i> sp.

Cuadro 2. Número de muestras ingresadas al laboratorio de Entomología durante el 2021

No. de muestras	Cultivo	Tipo de análisis	Localidad	Síntomas	Diagnóstico
1	Maíz	Nematológico	Balzar	Conocer cantidad de nematodos depredadores provistos en el envase	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> en estado inactivo
12	Banano	Nematológico	Buena Fé	No especificaron	Poblaciones de nematodos fitoparásitos <i>Radopholus similis</i> , <i>Helicotylenchus</i> spp, <i>Meloidogyne</i> spp.
1	Cacao	Entomológico	Esmeraldas	Presencia de insectos perforadores en la mazorca y sus daños son considerables	Poblaciones del lepidóptero <i>Gymnandrosoma</i> spp. en estado de larvas, pupas y adultos. Además, individuos de coleópteros de la familia Bruchidae
1	Maíz	Nematológico	Balzar	Conocer cantidad de nematodos depredadores provistos en el envase	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> en estado activo e inactivo
1	Balsa	Entomológico	Esmeraldas	Coloración oscura ascendente desde la parte basal de la planta hasta 50 cm del tronco, en la base de la planta observaron perforaciones	Individuos de coleópteros pertenecientes a las familias Curculionidae y Cerambycidae

Conclusiones:

El mayor número de muestras ingresadas al laboratorio de Fitopatología, provienen de la provincia de Los Ríos y son las empresas agrícolas las que realizan el mayor uso del servicio de análisis fitopatológicos. En los dos últimos meses del 2021, en el laboratorio de Entomología el mayor requerimiento fue de análisis nematológico para el cultivo de banano.

24

Recomendaciones:

La información obtenida durante el periodo de 2021 permite identificar los problemas fitosanitarios que se presentaron en la zona de influencia de la EET- Pichilingue, por tanto, es importante mantener anualmente información referente al porcentaje y tipo de análisis realizados en los laboratorios del Dpto. de Protección Vegetal.

Referencias:

- Arévalo M. H., Zenner de Polania, I. (2009). Evaluación de dietas merídicas para la cría en laboratorio de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Revista UDCA Actualidad & Divulgación científica 12(1):79-90.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.

Actividad 2. Etiología de la principal enfermedad de teca en Ecuador y rol de insectos en su dispersión

Responsable: Ph.D. Danilo Vera Coello (director de proyecto), EET-Pichilingue
Dr. Ernesto Cañarte (codirector de proyecto), EE-Portoviejo

Colaboradores: MSc. Edwin Borja Borja, Dra. Karina Solís, Mgs. Sofía Peñaherrera (EET-Pichilingue)
MSc. Bernardo Navarrete (EE-Portoviejo)

25

Este proyecto culminó al 30 de junio del año 2021, a continuación, se presenta el informe con los resultados más relevantes:

Antecedentes:

La teca es un árbol caducifolio que alcanza aproximadamente 30 metros de altura. En Ecuador se estima alrededor de 45000 hectáreas distribuidas en el Litoral ecuatoriano. El incremento de la superficie sembrada sin tomar en cuenta las condiciones de predisposición de suelos y climas para el desarrollo de este cultivo, aumenta los riesgos de daños causados por plagas y enfermedades. Varios reportes vinculan el incremento de la mortalidad por problemas fitosanitarios en plantaciones forestales, a eventos climáticos característicos de las zonas tropicales; estos eventos afectan directamente la dinámica de las poblaciones de insectos y de microorganismos patogénicos. En los últimos años se ha observado la presencia de una nueva patología conocida como “muerte regresiva” la cual se incrementa y afecta exponencialmente plantaciones en varias zonas del Litoral ecuatoriano.

En el 2015 un equipo multidisciplinario del INIAP, realizó un recorrido por varias zonas, con el objetivo de realizar un diagnóstico de la enfermedad muerte regresiva. Los microorganismos que se obtuvieron en las recolectas y que se asocian con la enfermedad estudiada fueron *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp. y *Ceratocystis* sp., así también, se recolectaron 123 especímenes de la familia Curculionidae, subfamilia Scolytinae, descrita como escarabajos ambrosia, que podrían estar asociados con la enfermedad.

La identificación del agente o los agentes causales de la muerte regresiva, contribuirá al desarrollo e implementación de estrategias de manejo de plagas y enfermedades que tienen como objetivo reducir las pérdidas económicas producidas por la enfermedad en plantaciones de teca. La estrecha colaboración interinstitucional de entidades ecuatorianas (INIAP y MAG a través de la Subsecretaría de Producción Forestal) y españolas (AECID e INIA), así como, con empresas privadas y productores de teca, permitieron una eficiente ejecución del proyecto a través del fortalecimiento de una red de investigación. Para ello se planteó el desarrollo del proyecto “Etiología de la “muerte regresiva” en teca, en Ecuador y rol de insectos en su dispersión”.

Se aprobó una subvención de 246.339,55 euros para la ejecución del proyecto, el mismo que inicialmente fue ejecutado en cinco provincias (Manabí, Esmeraldas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Guayas y Los Ríos), posteriormente se incluyó a la provincia de El Oro y en la región Amazónica, las provincias de Orellana y Sucumbíos

debido al elevado número de plantaciones de teca que fueron encontradas en esta área. Los beneficiarios directos del proyecto fueron los productores de teca, técnicos extensionistas gubernamentales y privados, docentes, estudiantes universitarios, entre otros. El proyecto procuró generar conocimiento que permitan desarrollar técnicas de manejo para prevenir y/o mantener umbrales bajos de infección de la enfermedad muerte regresiva dentro de las plantaciones de teca.

Objetivos:

26

1. Determinar la etiología de muerte regresiva en cultivos de teca.
2. Conocer el rol de los insectos escolitinos en la transmisión y dispersión de la enfermedad muerte regresiva.

1. Metodología y resultados:

Actividad 1.1. Recolecta y aislamiento de las cepas de microorganismos asociados a “muerte regresiva” (*Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* sp. y *Ceratocystis* sp).

Durante el 2018 y 2019 se visitaron 50 plantaciones comerciales de teca en las cinco provincias inicialmente planificadas. Ante los reportes de la enfermedad en otras provincias, se decidió visitar y muestrear 11 plantaciones comerciales en tres provincias (El Oro, Sucumbíos y Orellana). Finalmente, se logró muestrear 61 plantaciones interviniendo ocho provincias (ver Informes anuales 2019 y 2020), para ello se procedió de la siguiente manera:

1. Selección de las áreas de muestreo mediante un listado de las plantaciones de teca a nivel nacional, que fue proporcionado por la Subsecretaría de Producción Forestal (SPF) del Ministerio de Agricultura Ganadería (MAG). La selección se realizó considerando la concentración de plantaciones por área las condiciones agroclimáticas y la representatividad por cantones.
2. Para la recolecta de muestras, se seleccionaron de uno a dos árboles entre 3 y 8 años de edad, que presentaran síntomas aparentes de la enfermedad “muerte regresiva” (clorosis en el ápice, producción masiva de brotes epicórmicos). Posteriormente, con una motosierra se realizaron cortes transversales de aproximadamente 2 cm de grosor de tres secciones (tercio inferior, medio y superior) Por último, las muestras fueron etiquetadas bajo el siguiente formato (número de finca, número de muestra y sección) y colocadas en una hielera para su deterioro durante su traslado hasta el laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Tropical Pichilingue.
3. El aislamiento de microorganismos, se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal de la EETP, Para lo cual se utilizó dos medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA) más un antibiótico (cloranfenicol) y discos de *Daucus carota* L. (zanahoria). Para ello, se cortaron trozos de madera (0,5 x 0,5 cm) donde se observó la transición de la infección de las muestras obtenidas durante los muestreos realizados en las plantaciones, las

muestras fueron lavadas por un minuto con hipoclorito de sodio al 2,5%, enjuagadas tres veces con agua destilada estéril y colocadas sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua. Finalmente, fueron sembradas en platos Petri con PDA. También, se realizaron cortes aproximadamente de 0,5 cm de forma rectangular, lavadas con agua destilada estéril y colocadas sobre discos de zanahoria asemejando a un sánduche para aislar hongos del género *Ceratocystis* sp. Una vez obtenido los microorganismos y purificados se procedió con la identificación morfológica y conservación de las cepas.

Se visitaron 61 plantaciones de teca y se obtuvieron 120 aislados de los géneros *Fusarium*, *Lasiodiplodia* y *Ceratocystis*.

Actividad 1.2. Identificación del agente causal de muerte regresiva en teca a través de establecimiento de ensayos para confirmar los Postulados de Koch, en plántulas en vivero.

Haciendo uso de los resultados obtenido en la actividad anterior, se inocularon 150 plantas de teca con 15 tratamientos, inoculando con tres géneros de hongos aislados con mayor frecuencia (*Fusarium* spp., *Ceratocystis* sp. y *Lasiodiplodia* sp.) (Ver Informe anual 2019). La sintomatología externa fue evaluada semanalmente mediante una escala diagramática para medir la severidad de la enfermedad, la cual constó de cinco estados (1.- Árbol sano, 2.- Hojas terminales cloróticas. 3.- Brotes de ramas muertas, 4.- 50% follaje muerto, 5.- 80% necrosis en plantas). Los síntomas internos se evaluaron mediante disecciones longitudinales en el tallo empleando cinco variables (longitud de la infección arriba de la inoculación, longitud de la infección debajo de la inoculación, longitud total de infección, ancho de la infección y área de la infección).

Los datos obtenidos de estas variables fueron analizados mediante el uso de pruebas no paramétricas, test de proporciones y prueba Z (Informe anual del INIAP 2020). Según los resultados obtenidos el agente causal de este problema fitosanitario es el complejo de hongos *Ceratocystis fimbriata*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium solani* y *F. oxysporum*.

Actividad 1.3. Reactivación y caracterización molecular de los microorganismos aislados asociados a muerte regresiva (*Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp. y *Ceratocystis* sp.) y causantes de la enfermedad.

Esta actividad se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la EETP, donde se realizó la extracción del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) de 40 aislados de tres géneros *Ceratocystis* sp., *Fusarium* spp. y *Lasiodiplodia* sp. utilizando el kit de extracción A29790 (ver informe anual del INIAP 2019). Posteriormente, en la Estación Experimental Santa Catalina se realizó la cuantificación y liofilización de las muestras de ADN para la identificación de las especies. Las muestras de ADN liofilizados se enviaron a INIA-España para el análisis de secuenciación y su respectivo estudio.

Una vez realizada la identificación, los microorganismos según los investigadores del INIA- España correspondieron a: *Lasiodiplodia theobromae* (26% de las muestras),

Ceratocystis fimbriata (16%), *Thielaviopsis basicola* (12%), *Fusarium solani* (10%), seguidos en menor proporción por *Curvularia lunata* o *C. aerea* (4%), *F. oxysporum* (4%) y *F. graminearum* (2%). Hay que añadir un 16% de *Fusarium* spp. que por su índice de similitud podrían identificarse como distintas especies de *Fusarium*: *F. oxysporum* o *F. equiseti* o *F. solani* o *F. incarnatum* o *F. verticillioides* o *F. begoniae* o *F. anthophilum*. Adicionalmente se recabó información de georreferenciación de los lugares donde fueron tomadas las muestras.

Actividad 1.4. Fortalecimiento de conocimientos, socialización y difusión de resultados preliminares.

En el 2018, se realizó el taller de socialización del proyecto para mostrar ante los investigadores del INIAP, técnicos extensionistas del MAGAP, técnicos de AGROCALIDAD y productores de teca asociados, las actividades que se estaban desarrollando dentro de la ejecución del proyecto. En el 2019, se organizó un taller en la EE - Portoviejo, donde se exhibió a los asistentes muestra de teca (trozo) con presencia de síntomas internos de muerte regresiva y muestras de individuos capturados con las trampas y las actividades de investigación ejecutadas. Se atendió la visita del Ministro de Relaciones Exteriores, Joseph Borrel y una delegación española. Se participó en el XXVII Congreso Chileno de Fitopatología en la ciudad de Tarapaca-Chile, mediante ponencia se dio a conocer los resultados de la identificación de microorganismos fúngicos asociados a la muerte regresiva en 32 plantaciones comerciales de teca en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos y Guayas. También, se participó en un Stand por el día mundial del suelo en la EETP donde se socializaron las actividades de investigación realizadas en el proyecto. A este evento asistieron más de 700 personas entre estudiantes, agricultores, técnicos extensionistas, académicos y autoridades gubernamentales. Finalmente, durante el tiempo de ejecución del proyecto se socializó y difundió los resultados a 1200 personas.

Actividad 2.1. Determinación del rol de insectos escolítinos (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae) en la transmisión y dispersión de la enfermedad muerte regresiva. EE-Portoviejo.

El estudio de campo se realizó en las mismas localidades consideradas en la actividad 1.1. Mientras que los estudios de laboratorio e invernadero se desarrollaron en la EE - Portoviejo y EETP. En 50 plantaciones comerciales de teca en las provincias de influencia del proyecto, se colocaron trampas elaboradas con botellas plásticas de 1 litro de capacidad, se realizó una abertura frontal para permitir el ingreso de los escolítidos. Dentro de cada trampa se colocó desinfectante para manos (75% etanol) cuyo objetivo es funcionar como atrayente. En cada plantación se colocaron 6 trampas distribuidas alternadamente a 1 y 2 m de altura del suelo.

Las trampas se retiraron a las veinticuatro horas y se colocó su contenido en frascos con alcohol (96%) para su traslado hasta el laboratorio de entomología de la EEP. Los insectos fueron clasificados a nivel de familia utilizando un estereomicroscopio y claves taxonómicas. Los especímenes de la familia Curculionidae: Scolytinae fueron separados por morfoespecie posteriormente se envió a los laboratorios de

Entomología Forestal y Hongos Fitopatógenos del INIA de España para su identificación. Además, en cada plantación fue recolectado una muestra de tronco de aproximadamente 20 cm de longitud, con presencia de perforaciones, las trampas se conservaron en bolsas plásticas, etiquetadas y transferidas al laboratorio de entomología de la EEP.

Como resultado final tenemos la captura de 1202 especímenes de Scolytinae, de estas se enviaron 70 especímenes a la Universidad de Michigan para su identificación taxonómica.

29

Actividad 2.2. Fluctuación poblacional de escolítinos asociados a la enfermedad muerte regresiva. EE-Portoviejo.

El experimento se realizó en tres plantaciones de teca ubicadas en Buena fe (Los Ríos), El Empalme (Guayas) y Olmedo (Manabí). Se instalaron seis troncos de teca sin síntomas (sin corteza y tres sin corteza) de 20 cm de longitud, Adicionalmente, los troncos fueron sumergidos en alcohol al 70 %, y distribuidos a una distancia de 25 m entre trampas y colocados a 1,5 m de altura desde la base de los árboles seleccionados. Los troncos permanecieron en las plantaciones por un periodo de 30 días, posteriormente fueron retirados, etiquetados, embalados y trasladados al laboratorio de Entomología de la EEP, donde fueron colocados en cámaras de confinamiento con el fin de recuperar los especímenes. Los troncos permanecieron 30 días, dentro de las cámaras realizando evaluaciones diarias, finalmente se tomaron dos troncos por cada una de las plantaciones con el objetivo de realizar un conteo y seguimiento a los diferentes estados biológicos barrenadores (Informe anual INIAP 2019).

Actividad 2.3. Capacidad de insectos vectores de la enfermedad muerte regresiva. EE-Portoviejo y EET-Pichilingue.

Esta actividad se desarrolló en dos fases: la primera, tuvo lugar en las tres plantaciones de la actividad anterior, donde se colocaron dos troncos centinelas (sin corteza y sumergidos en alcohol al 70% aproximadamente por un minuto) transcurrido los 30 días los troncos fueron trasladados hasta el laboratorio de Fitopatología de la EETP, donde fueron disecado para observar las galerías realizadas por los escolítidos y recuperar los insectos presentes. Las galerías se cortaron y fueron sembradas en medio de cultivo PDA y sobre discos de zanahoria para observar el posible crecimiento de organismos asociados a los insectos y capaces de causar la enfermedad. Los insectos se lavaron con agua destilada estéril y el producto de este lavado fue sembrado en PDA. A continuación, los insectos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2,5% y enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, los insectos fueron macerados y sembrados en PDA (Informe anual INIAP 2019 y 2020).

La segunda fase, se tenía planificado desarrollarse en la casa de vegetación de la EEP utilizando 150 plántulas de teca de más de un año de edad con escolítinos en etapa adulta. El objetivo de este ensayo es observar si los insectos tienen la capacidad de realizar perforaciones en el tallo de las plantas. Y seis meses después

de infestadas las plantas los tallos serán disecados y se evaluará el número de perforaciones, longitud de galerías, presencia de colonias de la especie Scolytinae (huevo, larva, pupa adultos), presencia o ausencia de hongos causantes de la enfermedad, identificación morfológica de los hongos y porcentajes de plantas enfermas. Esta actividad se vio retrasada por la situación sanitaria, que obligó a retirarse de las estaciones y mantenerse en actividades de teletrabajo.

Una vez que las actividades se restablecieron parcialmente, se continuó con esta actividad. Se realizaron pruebas preliminares en cinco plantas de teca, dos especímenes de *Xyleborus* sp. fueron confinadas en mangas entomológicas elaboradas con mallas antiáfidos, la evaluación se realizó todos los días. Hasta el día 10 de monitoreo se observó que los insectos no fueron capaces de perforar y crear galerías, por lo que no ovipositaron y murieron al pie de cada planta. Esto pudo deberse a que el tallo de las plantas de teca de dos años de edad aún no les brinda a las hembras de esta especie las condiciones de colonización, principalmente para su progenie (Informe anual INIAP 2020).

30

En reemplazo del uso de las plantas en casa de vegetación se utilizaron troncos centinelas infestados en campo confinados en jaulas entomológicas junto a troncos sin presencia de insectos. Se evaluó el número de perforaciones, longitud de galerías, presencia de colonias de la especie Scolytinae utilizada en la infestación artificial y la presencia o ausencia de hongos causantes de la enfermedad muerte regresiva. Para el procesamiento de los troncos centinela se utilizará la metodología descrita en la actividad 1.1 y se sembraron trozos de las galerías sobre medio PDA y discos de zanahoria.

Los insectos fueron recuperados y se lavaron con agua destilada estéril, el producto de este lavado se sembró en medio PDA. Adicionalmente, se procedió a desinfectar los insectos con hipoclorito de sodio al 2,5% y enjuagados tres veces con agua destilada estéril y se procedió a realizar un macerado y se sembró en PDA más cloranfenicol. Finalmente, se aisló microorganismos del género *Lasiodiplodia* y *Fusarium* a partir de galerías realizadas por insectos de la subfamilia Scolytinae.

Actividad 2.4. Socialización, capacitación y difusión de resultados del proyecto. EE-Portoviejo y EET-Pichilingue

Esta actividad fue desarrollada conjuntamente con la Actividad 1.4., exceptuando la participación en el Congreso Chileno de Fitopatología. Por esa razón, se participó en una ponencia oral en la III convención científica de la Universidad Técnica de Manabí, con el estudio de Escarabajos presentes en plantaciones de teca en el Litoral ecuatoriano.

Los resultados obtenidos cumplieron con los objetivos propuestos, se determinó a *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp. y *Ceratocystis* sp., o el complejo de los tres hongos como el agente causal de la muerte regresiva en plantaciones de teca en Ecuador. Se ha determinado el rol de insectos escolítinos (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en la transmisión y dispersión.

Conclusiones:

Se determinó que *C. fimbriata*, *L. theobromae* y *F. oxysporum* causaron la infección en plantas de teca. Por tanto, se concluye que el agente causal de la enfermedad “muerte regresiva” de la teca es el complejo de estos microorganismos. Sin embargo, es importante tener en cuenta el grado de patogenicidad de cada uno, siendo *C. fimbriata* el que tuvo mayor agresividad.

Se determinó que la masiva producción de brotes epicórmicos, es un síntoma inicial muy característico de la enfermedad de muerte regresiva, este síntoma se produce generalmente antes del apareamiento de la clorosis o amarillamiento en el ápice de los árboles.

31

Recomendaciones:

Realizar monitoreos fitosanitarios anuales en las plantaciones de teca, para detectar la enfermedad de manera oportuna y tomar medidas preventivas para reducir nuevas infecciones/focos.

La teledetección podría ser una alternativa para complementar los sistemas tradicionales de muestreo en campo, utilizando sensores remotos e imágenes capturadas con drones, lo que permitirá obtener información sin tener contacto con el objeto de estudio.

Debido a la naturaleza de la infección, la forma de manejar este tipo de problemas fitosanitarios es a través de medidas preventivas, por tanto se recomienda realizar podas anuales únicamente durante la época seca, desinfectar las herramientas y sellar las heridas con caldo bordelés.

Implementar estudios *in vitro* e *in vivo* para determinar la capacidad antagonista de los microorganismos benéficos y confrontarlos con el complejo de hongos que ocasionan la enfermedad, así como evaluar el efecto de moléculas o pesticidas comerciales.

Referencias:

- Agrios, G. N, 2005, Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, 952 p.
- Arguedas, M.; Chaverri, P.; Verjans, Jean-Marc. 2004. Problemas fitosanitarios de la teca en Costa Rica. Recursos Naturales y Ambiente/2004. pp. 130-135.
- Carbone, I., Kohn, L.M. 1999. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. *Mycologia*, Vol. 91, No. 3, pp. 553-556.
- Di Rienzo J, Casanoves F., Balzarini M., Gonzalez L., Cuadroda M. & Robledo W. 2016. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- ESRI. 2015. Instalación de ArcGis desktop 10.2.2 (Versión de prueba). <http://www.esri.com/software/arcgis/arcgis-for-desktop/free-trial>. Consultado: 11/03/2019.

- Gentleman, R., Ihaka, R. 2000. Lexical scope and statistical computing. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 9: 491-508.
- IBM Corp. 2019. IBM SPSS Statistics for Windows 24.0
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), 2015. Informe visita técnica sobre el estado fitosanitario de plantaciones de teca en el Litoral ecuatoriano. Primera edición, Quevedo, Ecuador. 25 p.
- Jacobs, K., Bergdahl, D.R., Wingfield, M.J., Halik, S., Seifert, K.A., Bright, D.E., and Wingfield, B.D. 2004. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycol. Res.* 108 (4): 411–418
- Liu, Y.J., Whelen, S., and Hall, B.D. 1999. Phylogenetic Relationships Among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. *Mol. Biol. Evol.* 16(12): 1799–1808.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), 2015. Programa de Incentivos para la Reforestación con Fines Comerciales. Primera edición, Guayaquil, Ecuador 56 p. <http://ecuadorforestal.org/wp-content/uploads/2014/06/SPF-FOLLETO-PIF-2014-050614.pdf>.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), 2016. Reservorio genético de teca en Ecuador proyecto La Mayronga. Esmeraldas, Ecuador. 34-36 p.
- Méniard, J. 1930. Le teck et sa propagation en Afrique tropicale. *CR Assoc Colonies Sci, Comité Nat Bois Coloniaux*.
- Ploetz, R.C. 2006. "Fusarium-Induced Diseases of Tropical, Perennial Crops." *Phytopathology* 96, No. 6: 648-52.
- Sharma, J., Mohanan, C. and Florence, E. 1985. Disease survey in nurseries and plantations of forest tree species grown in Kerala. Kerala, IN, Kerala Forest Research. 275 p.
- Vera, D., Cañarte, E., Navarrete, B., Solís, K., Muñoz, X., Cevallos, V. y Borja, E. 2019. Muestreo de enfermedades vasculares e insectos barrenadores asociados a teca (*Tectona grandis* L.f.) y alternativas para su manejo. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Ecuador. 1era edición, 130 p.
- Weaver, P.L. 1993. *Tectona grandis* L.f. Teak. SO-ITF-SM-64. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 18 p.
- White, T. J., Bruns, T. D., B., L. S., and W., T. J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322. Academic Press, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.

Proyecto 3: Determinar el agente causal de la muerte regresiva en cacao.

Responsable: Mgs. Sofia Peñaherrera.

Colaboradores: Dra. Karina Solís, P.h. Danilo Vera, MSc. Edwin Borja (INIAP) y Mgs. Pedro Terrero (Agrocalidad)

Antecedentes:

Ecuador es el primer exportador mundial de cacao fino y de aroma, esto lo convierte en un rubro de gran importancia para la generación de empleo, ingresos económicos y divisas para el país. Sin embargo, muestra los rendimientos más bajos de la región y su cadena productiva presenta riesgos que merman su producción. El cacao es una especie fundamental del sistema agroforestal campesino, es considerada una planta reforestadora, ya que convive en equilibrio con una amplia diversidad de flora y fauna. El factor que más limita su producción es la presencia de enfermedades, entre las que destacan la monilia (*Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans, Stalpers, Samson y Benny) y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime y Phillips-Mora) que ocasionan pérdidas de hasta el 80% de la producción (Rodríguez y Fusco, 2017).

Existen otros patógenos que inciden en la disminución de los rendimientos como el hongo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. Esta especie fue descrita por primera vez en 1890 por Saccardo, afectando frutos de cacao en Ecuador (Crous & Palm, 1999). En los últimos años se ha observado una marchitez afectando a los brotes, ramas terminales y raíces, estos síntomas son la manifestación de la enfermedad conocida como muerte regresiva (o "Die back"), con la aparición de "puntas desnudas" o "astas de venado". *Lasiodiplodia* es un patógeno con una amplia gama de huéspedes, causa pudrición y muerte regresiva en las especies que infecta. En post cosecha es una enfermedad común de los cítricos, conocida como pudrición del pedúnculo. Este hongo penetra a través de heridas y de tejidos en descomposición (Alves, *et al.*, 2008).

En cacao, el inóculo inicial lo constituyen las densas aglomeraciones de picnidios del hongo (de color negro a manera de carbón), presente en las mazorcas sobre maduras, enfermas y momificadas que permanecen en las plantas. Desde allí, los conidios son dispersados por el viento, el agua, los implementos de trabajo o los insectos perforadores del tronco, que se encargan de diseminar el hongo. Las manchas en los frutos se desarrollan en forma rápida, recubriéndose con las estructuras del hongo en unos ocho días, lo cual se acelera si presentan heridas (Solís, Peñaherrera y Vera, 2021).

Lasiodiplodia es un hongo ascomycete, pleomórfico, ubicuo y plurívoro, por lo que ha tenido más de un sinónimo, es cosmopolita y tiene una amplia gama de hospederos, incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, especialmente de los trópicos y subtrópicos. Su micelio es granular, ramificado y septado, de color gris oscuro, con un agregado de hifas y estromas, donde se visualizan los picnidios agrupados, con ostiolas que dan salida a picnidio esporas hialinas, ovals y unicelulares cuando son jóvenes y recién separadas del picnidio, oscuras y septadas cuando son maduras y libres (Puig *et al.*, 2021).

Este hongo ha sido identificado en enfermedades en aproximadamente 280 especies de plantas vasculares, entre las cuales se incluye al cacao (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

La presencia de enfermedades es uno de los factores para la disminución en la producción del cacao, ocasionando pérdidas económicas de hasta 60%, mientras que en Ecuador y Colombia registran pérdidas del 80 y 100% de la producción (Ramírez, 2016; Pérez, 2018). *Lasiodiplodia* puede desencadenar efectos muy variados sobre el cultivo de cacao, dependiendo del tipo de manejo agronómico que se realice, pudiendo ocasionar la muerte de la planta. Ante todas estas dificultades presentadas en la región y con el objeto de mejorar las condiciones de las plantaciones contra esta enfermedad y proporcionar las medidas de manejo de la enfermedad, se realizó esta investigación mediante la caracterización y evaluación de la variabilidad de los aislamientos obtenidos de diferentes localidades del Ecuador.

34

Objetivos:

1. Identificar morfológicamente los aislados de *Lasiodiplodia* sp., obtenidos de plantas de cacao con síntomas de muerte regresiva.
2. Determinar la patogenicidad de *Lasiodiplodia* sp., en plántulas de cacao de los clones EETP 800, EETP 801, CCN 51.

Metodología:

Características del sitio experimental

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección Vegetal en la EET- Pichilingue. Los aislados se recolectaron de plantaciones en las provincias de Los Ríos y Guayas.

Factor en estudio

Factor A:	Aislado	<i>Lasiodiplodia</i> La Guayas 1 <i>Lasiodiplodia</i> Pichilingue 2
Factor B:	Clon	EETP 800 EETP 801 CCN 51

Unidad experimental

La unidad experimental fue la planta de cacao (clon) inoculada con cada aislado de *Lasiodiplodia*.

Tratamientos

Los tratamientos (Cuadro 3) estuvieron conformados por dos aislamientos de *Lasiodiplodia* de La Guayas (El Empalme) y Pichilingue (EETP) inoculado en los clones EETP 800, EETP 801 y CCN 51.

Cuadro 3. Tratamientos para determinar el agente causal de la muerte regresiva.

T1	<i>Lasiodiplodia</i> 1	EETP-800
T2	<i>Lasiodiplodia</i> 1	EETP-801
T3	<i>Lasiodiplodia</i> 1	CCN-51
T4	<i>Lasiodiplodia</i> 2	EETP-800
T5	<i>Lasiodiplodia</i> 2	EETP-801
T6	<i>Lasiodiplodia</i> 2	CCN-51
T7	Testigo (PDA)	EETP 800
T8	Testigo (PDA)	EETP-801
T9	Testigo (PDA)	CCN-51

Aislamiento de *Lasiodiplodia* sp.

Se utilizaron dos aislados de *Lasiodiplodia* sp., que se obtuvieron de muestras de ramas de cacao, con su zona de avance asintomático estas se lavaron con agua destilada, se cortaron en porciones (de aproximadamente 3-5 mm de diámetro) de la zona de avance de la enfermedad, se desinfectó en una solución de hipoclorito al 5 % por 1 minuto para eliminar microorganismos superficiales, se dejaron secar sobre papel toalla estéril. Cinco porciones de tejido, se sembraron en placas Petri conteniendo medio de cultivo Potato Dextrosa Agar (PDA, marca Difco®).

Para la obtención de cultivos puros, se tomaron puntas de hifas de cada aislado fungoso, incubado en medio de cultivo PDA de tres días de crecimiento a 20°C. Las placas Petri de los aislados se mantuvieron en condiciones de 20 -22°C por 5 días con régimen de 12h/12h luz/oscuridad, hasta observar crecimiento micelial.

Caracterización morfológica de *Lasiodiplodia* sp.

Se realizó con microscopía de luz, se observó el crecimiento de las colonias en medio de cultivo PDA y se realizó mediciones de las conidias. Los cultivos se examinaron semanalmente por la formación de conidias que se obtuvieron de picnidios, forma (ovoide), color, presencia o ausencia de septas. El largo y el ancho de conidias se midió en 15 conidias de cada aislado de *Lasiodiplodia* sp., utilizando un microscopio óptico (marca Zeiss). Se realizaron preparaciones microscópicas de las estructuras fructificantes formadas en las colonias en láminas porta y cubreobjetos, las cuales se observaron al microscopio para la identificación mediante las claves de Barnett y Hunter (1996) Sutton (1980) y el descriptor de la Commonwealth Mycological Institute CMI 1974.

Inoculación y re-asilamiento de *Lasiodiplodia* sp.

Para la inoculación del hongo se manipularon plantas de 8 meses de edad, se realizó una herida de 5 mm de diámetro en el tallo, utilizando una lámina de bisturí estéril, ejerciendo una presión leve en el tallo. En el área del tejido expuesta se colocó una rodaja (5 mm de diámetro) de PDA con micelio de 6 días de *Lasiodiplodia*. La herida inoculada se cubrió con una bolita de algodón humedecido con agua destilada estéril para generar humedad al hongo y se protegió con cinta parafil. A los 6 días se retiró el

algodón y la cinta parafilm (metodología adaptada de Urbez-Torres et al., 2008). El tratamiento testigo fue inoculado con rodaja de PDA. Después de un mes de incubación, se evaluó la incidencia y para finalizar se realizó un re-aislamiento en PDA de cada tallo para confirmar los postulados de Koch (Fig 2).

Resultados:

En la observación al microscopio, se identificaron colonias con crecimiento de micelio de color gris ahumado y la presencia de picnidios a los 20 días de incubación (Figura. 2 B-C). Así como conidios producidos y formados por una sola célula, de forma ovalada, hialinos y de doble pared, en conidios maduros estos mostraron una coloración marrón oscura, dos células, lo cual coincide con estructuras reproductivas asexuales asexuales del género *Lasiodiplodia*, lo que concuerda con lo reportado por Phillips et al., 2013.

36

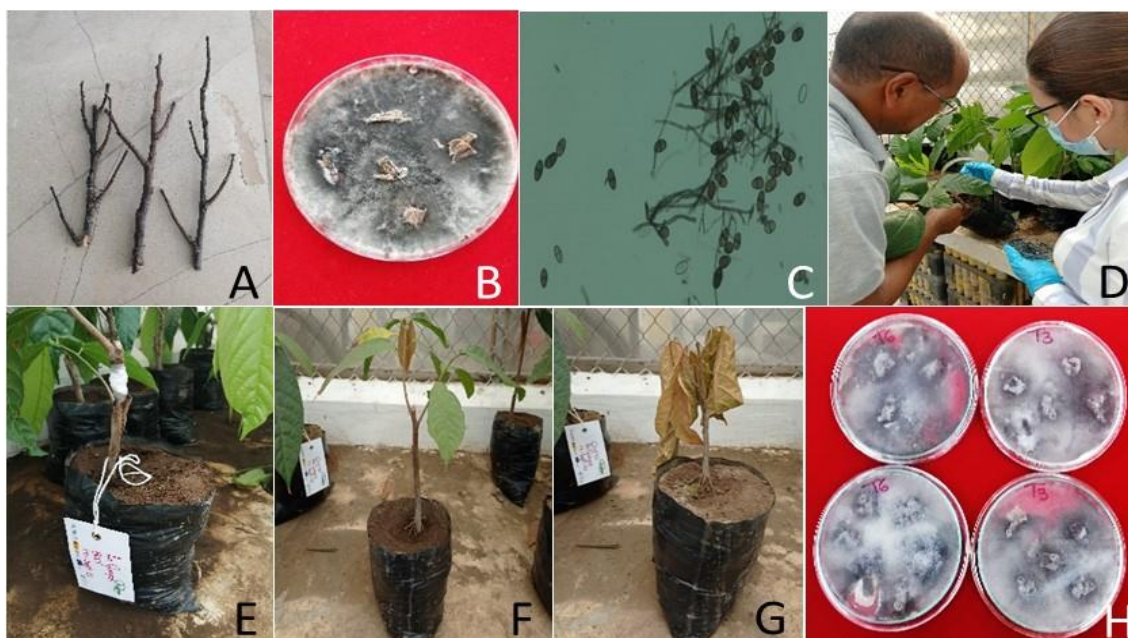


Figura 2. A) Ramas de cacao. B) Aislamiento de *Lasiodiplodia* sp., en medio PDA. C) Conidios de *Lasiodiplodia* sp. D) Inoculación de *Lasiodiplodia* en plantas de cacao. E) Planta inoculada. F) Síntomas iniciales. G) Muerte de planta. H) Reaislamiento de *Lasiodiplodia* sp., en medio PDA.

El comportamiento del patógeno inoculado, se diferenció en cada huésped (Cuadro 4), el primer síntoma de clorosis se observó al día 14 (clon CCN51), luego se observaron un mayor número de individuos con tejidos necrosados (Figura. 2 D-G), en relación al primer día de evaluación, llegando al final del ensayo (30 días) con plantas muertas y un número de genotipos con cierto grado de tolerancia a *Lasiodiplodia* sp.

Los aislados de *Lasiodiplodia* (Figura. 3) inoculados en el genotipo CCN 51, causaron la muerte del mayor número de plantas, observándose el 100% (La Guayas) y el 87% (Pichilingue) de plantas muertas. El patógeno inoculado en los genotipos EETP 800 y EETP 801 afectó un menor número de plantas. En el tratamiento testigo no se observó mortalidad. Finalmente, luego de la evaluación de la mortalidad de las plantas, de éstas se reaisló *in vitro* el hongo en el medio PDA (Figura. 2H).

Cuadro 4. Incidencia de *Lasiodiplodia* en genotipos de cacao inoculados.

Tratamientos	% Incidencia
<i>Lasiodiplodia</i> 1 + EET-800	20,00
<i>Lasiodiplodia</i> 1 + EET-801	13,33
<i>Lasiodiplodia</i> 1 + CCN-51	100,00
<i>Lasiodiplodia</i> 2 + EET-800	26,67
<i>Lasiodiplodia</i> 2 + EET-801	20,00
<i>Lasiodiplodia</i> 2 + CCN-51	86,67
Testigos (inoculados con PDA)	0

37

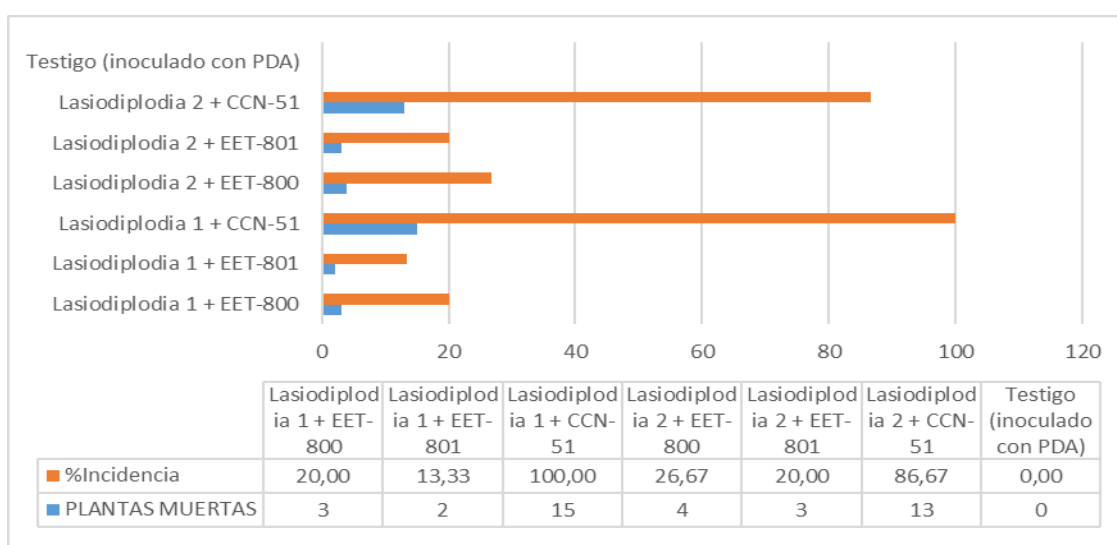


Figura 3. Incidencia y número de plantas muertas inoculadas con *Lasiodiplodia*. EET-Pichilingue 2021.

Conclusion:

Los genotipos EETP 800 y EETP 801 mostraron tolerancia a *Lasiodiplodia* en comparación con el clon CCN 51 que fue susceptible y se realsó el patógeno de las plantas muertas.

Recomendacion

Al finalizar este experimento, se sugiere continuar con investigaciones dirigidas a la inoculación de otros genotipos de cacao para identificar fuentes de resistencia y materiales tolerantes al patógeno. Por otro lado, se recomienda realizar la caracterización molecular del patógeno, así como ensayos *in vitro* en búsqueda de potenciales agentes de control biológico y pruebas con fungicidas y productos bioracionales.

Referencias Bibliográficas

Abdollahzadeh, J.; Mohammadi-Goltapeh, E.; Zare, R. and Phillips, A. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*, 25:1-10.

- Alves, A.P.W. Crous, Al Correia, and A. J.L. Phillips. 2008. Morphological and molecular. Data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Divers. 28:1-13.
- Barnett, H. and Hunter, B. 1996. Illustrated general of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. U.S.A. 218 p.
- Crous, P. and Palm, M. 1999. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. Sydowia, 52:167-175.
- Pérez, L. 2018. *Moniliophthora roreri* H.C. Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. Rev. Protección Veg., 33(1): 1 – 13.
- Phillips, J. L., Alan, Slippers Bernard, Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. 2013b. Plant pathogenic and endophytic Botryosphaerales known from culture. Studies in Mycology 76:84.
- Puig, A.S., Keith, L.M., Matsumoto, T.K. et al. Virulence tests of *Neofusicoccum parvum*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Phytophthora palmivora* on *Theobroma cacao*. Eur J Plant Pathol 159, 851–862 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02210-1>
- Ramírez, J. 2016. Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora* spp., y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al., en la hacienda *Theobroma*, Colombia. Rev. Protección Veg., 31(1): 42-49.
- Rodríguez, D. y Fusco, M. 2017. Gestión de riesgos agropecuarios en el sector del cacao en Ecuador. Revista de Investigación en Modelos Financieros, 1(1).57-74.
- Solis, K., Peñaherrera, S., Vera, D. 2021. Las enfermedades del cacao y las buenas prácticas agronómicas para su manejo. Guía No. 178. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). ISBN: 978-9942-22-531-3.
- Sutton, B. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, kew, Surrey, England 696 p.
- Urbez-Torres, J. R.; Leavitt G. M.; Guerrero, J. C.; Guevara, J. and Gubler, W. D. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the agents causal of bot canker disease of grapevines in Mexico. Plant diseases, 92: 519-529.
- Wang, F.; Zhao, L.; Li, G.; Huang, J. and Hsiang, T. 2011. Identification and characterization of *Botryosphaeria* spp. causing gummosis of peach trees in Hubei Province, Central China. Plant Disease, 95:1378-1384.

Proyecto 4. *Trichoderma* spp. como inductor de resistencia en vitroplantas de banano (*Musa* AAA) cv. Gros Michel contra *Fusarium oxysporum* f. *cubense* (Smith) Snyder & Hansen.

Responsables: Dra. Karina Solís H., Ing. Karen R. Mayorga M.

Colaboradores: MSc. Iván Garzón, Mgs. Sofía Peñaherrera, Ph.D. Danilo Vera.

Antecedentes:

39

El cultivo de musáceas tanto el banano como el plátano representan un importante pilar para la socio-economía y seguridad alimentaria del país. Estos cultivos se ven afectados por problemas fitosanitarios, que podrían ocasionar la muerte de las plantas, lo que representa una amenaza latente para los productores, tanto en el aspecto económico, como en la falta de conocimiento para su control, por lo que constantemente están buscando formas de controlar los ataques fitosanitarios (Cedeño, 2018).

América Latina y el Caribe es la zona de mayor producción para exportación hacia el mundo, la (FAO 2019), mencionó que, en el 2019, Ecuador y Filipinas obtuvieron la oferta fuerte de crecimiento en las exportaciones mundiales de plátano, alcanzando los 20,2 millones de toneladas, las cuales son un nuevo récord, con aumento del 5% en comparación con el periodo 2018.

Entre las enfermedades que afectan al cultivo de musáceas, la marchitez vascular (también llamada mal de Panamá), cuyo agente causal es el hongo *Fusarium oxysporum* f. *cubense* (Smith) Snyder & Hansen, por su naturaleza sistémica de ataque se la considera como una gran amenaza a nivel mundial para la industria bananera y platanera, siendo la enfermedad más destructiva del banano y la de mayor importancia, al considerarse que el organismo causal probablemente co-evolucionó con el banano. Inicialmente dos razas de *F. oxysporum* f. *cubense* (*Foc*) fueron reconocidas, denominándolas como *Foc* raza 1 (*FocR1*), que ataca a los clones Gros Michel y Manzano, *Foc* raza 2 ataca a Bluggoe o topocho. Posteriormente aparecieron *Foc* raza 3 en especificidad hacia heliconias y actualmente *Foc* raza 4 tropical que ataca a las musas, incluido al cultivar Cavendish (Brenes, 2017).

Durante 1940 a 1950 la marchitez vascular por *Foc* raza 1, ocasionó la desaparición comercial del cultivar Gros Michel en el Caribe y América Latina. Ecuador registraba 160.000 hectáreas de este cultivo que fueron sustituidas por Cavendish, que es un grupo varietal resistente a la enfermedad y actualmente representa la variedad básica del comercio mundial (CNUCED INFOCOMM, 2002).

Para el control de la marchitez vascular, se han propuesto varias alternativas de manejo del cultivo, entre las cuales el control biológico figura como una opción potencial. Al tratarse de una enfermedad fungosa y sistémica, el uso de especies de *Trichoderma* Pers., como agentes de control biológico (ACB) se considera como una alternativa viable, por su eficacia antagónica contra fitopatógenos foliares y del suelo, su capacidad cosmopolita (estar presente en todas partes), endófito y no patogénico de plantas superiores. *Trichoderma* spp., actúan a través de la competencia por

sustrato, producción de toxinas, induciendo la resistencia por medio de fitoalexinas y el micoparasitismo. Además, son resistentes a muchos compuestos tóxicos, incluidos los metabolitos producidos por la microflora del suelo y las plantas, fungicidas, herbicidas y antibióticos.

Estos hongos también pueden actuar como agentes promotores de crecimiento en plantas. Especies de *Trichoderma* se utilizan para el control de un amplio número de patógenos del suelo por su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación. En la acción controladora de *Trichoderma*, se han descrito diferentes mecanismos, entre los principales encontramos la competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y la antibiosis (Román, 2018). *Trichoderma* spp., consiguen movilizar y absorber nutrientes en comparación con otros organismos, la falta de nutrientes fácilmente accesibles en el suelo priva a los patógenos y controla su crecimiento. Cepas de *Trichoderma* pueden producir sideróforos, que se ligan al hierro de otros microorganismos como *Pythium*, que necesita del hierro para sobrevivir (Chiriboga, et al., 2015).

40

Entre las especies de *Trichoderma*, la más estudiada ha sido *T. harzianum* que se caracteriza por la producción de toxinas y antibióticos (Romero, et al., 2009). Por otro lado, *T. virens* es un hongo antagonista, de acción preventivo en el control biológico par enfermedades fúngicas, la actividad fúngica se le atribuye en parte a la producción de gliotoxina, también estimula el crecimiento y desarrollo vegetativo de las plantas, coloniza las raíces y evita que otros hongos fitopatógenos afecten la parte radicular (Ramírez, 2014). Finalmente, *T. asperellum* se menciona como inhibidor de los patógenos que causan la marchitez como *Fusarium* (Wu, Sun, Ni, Yu, Yu, y Dou, 2007).

Una de las limitantes actuales de la producción de musáceas (plátano - banano) es la aparición de la nueva variante del hongo denominada como *Foc* raza 4 tropical (*Foc* R4T), que ingresó en Colombia (García, et al., 2020) y Perú (Acuña, et al., 2021). Conociéndose que en Ecuador el cultivo de banano es un rubro indispensable para la economía, surge la necesidad de realizar investigaciones para obtener el sustento científico y alternativas tecnológicas que permitan contrarrestar los daños, en un posible escenario de su ingreso al país.

En nuestro país no es posible realizar los estudios *in situ*, ya que no tenemos el patógeno. Sin embargo, es posible realizar el estudio con *FocR1*, ya que los síntomas, desarrollo y adaptabilidad en su huésped susceptible son similares a *Foc* R4T. Es decir, si logramos obtener a) una simbiosis de *Trichoderma* spp., en el cultivar Gros Michel y b) una competencia con *FocR1*, dicha interacción se podría usar como un modelo para en su momento poder desarrollarlo para banano tipo Cavendish. Por otro lado, la biotecnología es una de las herramientas disponibles para estudiar dicha interacción, entre los microorganismos y las musáceas. Aprovechando, la obtención de vitroplantas, a partir del tejido meristemático y realizar inoculaciones de cepas de *Trichoderma* spp., en fase de pre-aclimatación, servirá para que estas se acoplen a los haces vasculares de las plantas de banano, generando así un grado de tolerancia a patógenos como *F. oxysporum*.

Con estos antecedentes los Departamentos de Protección Vegetal y Biotecnología, plantearon este trabajo de investigación para determinar el comportamiento de

Trichoderma spp., como agente de control de *FocR1* en vitroplantas de banano Gros Michel, cuya fase de laboratorio (objetivo 1) se desarrolló en 2020 y la fase de vivero (objetivo 2 y 3) se desarrolló durante el 2021.

Objetivos:

1. Determinar *in vitro* el antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1, mediante cultivos duales.
2. Evaluar *in vivo* el efecto endófito de *Trichoderma* spp. en las plantas de musáceas mantenidas en umbráculo.
3. Determinar *in vivo* el antagonismo de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1, en plántulas de musáceas mantenidas en umbráculo.

41

Metodología:

La investigación se ejecutó en los laboratorios de Fitopatología del Dpto. de Protección Vegetal y del Dpto. de Biotecnología, de la EETP del INIAP, ubicados en el cantón Mocache, provincia de Los Ríos. Este proyecto tuvo una duración de 10 meses, periodo comprendido de agosto 2020 a mayo del 2021.

El proyecto fue sometido a Comité Técnico mediante Memorando N°. INIAP-EETP_DPV-2020-0044-MEM y N°. INIAP-EETP_DIR-2020-0709-MEM, aprobado en Acta de Reunión de Comité Técnico N° 025 CT-EETP-2020. Durante el 2021 se realizaron los ensayos *in vivo*.

1. Material vegetativo en estudio.

Se utilizaron las vitroplantas de banano de los cultivares Gros Michel y Cavendish propagadas *in vitro* a través de meristemas, en pre-aclimatación (con 4 hojas, crecidas en condiciones de laboratorio), que fueron proporcionados por el Departamento de Biotecnología de la EETP.

2. Preparación del inóculo de *Trichoderma* spp.

Los aislamientos de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. virens*), se cultivaron en platos Petri con papa dextrosa agar PDA durante siete días. Se agregó 5 ml de agua estéril en cada plato Petri y con una espátula se removió suavemente el micelio para desprender los conidios.

La solución obtenida se filtró con gasa para obtener la suspensión de conidios de cada aislado y se determinó su concentración mediante conteos en la cámara de Neubauer, el inóculo se ajustó a una concentración de 1×10^6 conidios ml^{-1} .

3. Bio-fortificación de vitroplantas con los aislados de *Trichoderma* spp.

Bajo condiciones de umbráculo se inocularon las vitroplantas de Gros Michel y Cavendish en la fase de pre-aclimatación con las tres especies de *Trichoderma*. En el protocolo establecido por el laboratorio de Biotecnología, en esta fase se desinfecta con el fungicida Captan, por este motivo se consideró realizar el experimento con y sin la aplicación del fungicida. La inoculación de los tratamientos se realizó al momento del trasplante del medio de cultivo a las bandejas con el sustrato de suelo relación 3-2 (tierra turba y pomino), al que se realizó carga microbiana.

42

Con una jeringa estéril se inoculó 1 ml de la suspensión (1×10^6 conidios ml^{-1}) de cada tratamiento con *Trichoderma* spp., en el suelo cerca del área radicular de las vitroplantas. Las bandejas inoculadas se dejaron en cámara húmeda (bolsas plásticas) durante ocho días (cada tres días se rociaba agua), luego se las colocaron en mesón durante 15 días más (rociando agua cada tres días).

Para determinar la colonización de *Trichoderma*, se realizó una evaluación destructiva de un grupo de plantas inoculadas con los tratamientos de *Trichoderma* spp., a los 30 días, se recolectaron las plantas y muestras de sustrato. Los análisis se realizaron en el laboratorio de Fitopatología.

3.1. Altura, peso de las plantas y volumen radicular.

Con una regla se midió la altura de las plantas y con un calibrador pie de rey el diámetro del pseudotallo a 1 cm del suelo. Las plantas se colocaron en vasos de precipitación, donde se remojaron con agua destilada por aproximadamente 1 hora, para que se desprenda el sustrato de las raíces. Luego se realizaron tres lavados sucesivos y se secaron en papel toalla. De cada planta, se separó la raíz y se colocó en una probeta con agua (21 ml) para registrar el desplazamiento de agua basándose en el principio de Arquímedes (Monge, 2007).

Posteriormente, tanto el pseudotallo como las raíces se colocaron por separado en bolsas de papel y se secaron en una estufa a 70°C durante 24 horas y se registró su peso seco en gramos.

3.2. Pigmentación clorofílica

Este proceso se realizó en bandeja y en el umbráculo. Se evaluó la pigmentación clorofílica con la ayuda de un medidor SPAD – 502, se seleccionaron tres plantas por tratamiento y repeticiones, se escogió hojas del mismo tamaño (Chávez *et al.*, 2020).

3.3. Recuperación de *Trichoderma* spp.

Se recolectó muestras de los sustratos de las plantas, se homogenizaron y procesaron en laboratorio a través de la técnica de dilución seriada en placa Petri con PDA, para observar la presencia de *Trichoderma*.

De cada tratamiento, se seleccionaron al azar 3 plantas, las cuales se lavaron con agua corriente y se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 5% durante un minuto, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y se colocaron en papel toalla estéril. Se cortaron segmentos numerados de la planta (raíz, tallo y hojas) que se inocularon en placas Petri con PDA, se incubaron a una temperatura de 25 ± 1 °C, durante cinco días y se observaron los microorganismos filamentosos cultivables.

4. Preparación de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Se preparó la suspensión de conidios para la inoculación (Lara, 2009), se utilizó en cultivo de *FocR1* de 10 días crecidos en PDA (aislado en laboratorio de Fitopatología, purificado e identificado por su morfología a través de microscopía de luz y molecular utilizando la PCR con cebadores específicos para este hongo en laboratorio de Biotecnología). En cada placa Petri se agregaron 5 ml de agua y con la ayuda de una espátula se removieron los conidios, se filtró con una gasa y se realizó el conteo en la cámara de Neubauer, la suspensión se ajustó a una concentración de 1×10^6 conidios ml^{-1} .

5. Bioensayo de antagonismo: inoculación de vitroplantas con *FocR1*.

Se utilizaron 180 plantas de banano Gros Michel y 60 de Cavendish, inoculadas con *Trichoderma* spp., al momento del trasplante a las bandejas de pre-aclimatación (donde estuvieron 30 días). Las vitroplantas se individualizaron en bolsas plásticas de color negro (6" x 8") conteniendo sustrato (3 partes de arena, 3 partes de cascarilla de arroz, 2 partes de arena de río, $\frac{1}{2}$ parte de tierra) y se las mantuvo en el umbráculo con riego cada tres días. A los 80 días (de trasplantadas en bolsa plástica) se realizó la inoculación del patógeno, colocando en el suelo 5 ml del inóculo preparado de *FocR1* a una concentración de 1×10^6 conidios ml^{-1} , antes de la inoculación se ocasionó un daño físico (usando una espátula) al sistema radicular para que el hongo ingrese. Se estableció un testigo absoluto de vitroplantas sin inoculación de *FocR1*, donde se añadió 5 ml de agua esterilizada. El bioensayo se mantuvo en el umbráculo durante un mes y se realizaron observaciones cada tres días hasta la presencia de los síntomas de la enfermedad.

5.1. Incidencia de *Foc R1*

La incidencia se evaluó a los 16 días, cuando la primera planta presentó síntomas externos característicos de la enfermedad, esta se calculó por el número de plantas con sintomatología y el total de plantas sanas. Las evaluaciones se realizaron 3 veces en la semana hasta el término del ensayo (Lara, 2009).

5.2. Severidad de *Foc R1*

La severidad de la enfermedad se evaluó según el grado de daño expresado, tanto síntomas internos y externos (los externos se evaluaron a medida que las plantas presentaban muerte). Esta variable se midió tres veces en la semana. Se usó la escala presentada en el cuadro 5 (Orjeda, 1998).

Cuadro 5. Escala de evaluación de síntomas de *F. oxysporum* f. sp. *cupense*.

Síntomas externos		
Valor	Amarillamiento	Marchitez
1	Ausencia de síntomas	Ausencia de síntomas
2	Amarillamiento en hojas viejas	Marchitez en hojas viejas
3	Amarillamiento en hojas bajas	Marchitez en hojas bajas
4	Amarillamiento en las hojas jóvenes	Marchitez en las hojas jóvenes
5	Severo amarillamiento	Servera marchitez
6	Muerte de la planta	Muerte de la planta

5.3. Pigmentación clorofílica

Se evaluó la pigmentación clorofílica con la ayuda de un medidor SPAD – 502, se seleccionaron tres plantas por tratamiento y repeticiones (Chávez *et al.*, 2020).

5.4. Altura de planta

Con una regla se midió la altura de las plantas desde el suelo hasta la hoja bandera.

5.5. Recuperación de *FocR1* y *Trichoderma* spp.

Al concluir el experimento (25 DDI), se recolectaron las plantas inoculadas con *FocR1* que presentaron los síntomas de la enfermedad y 10 gramos de suelo. Las muestras se llevaron en bolsas plásticas al laboratorio donde se analizaron. Las muestras de tejido vegetal se lavaron con agua corriente para remover impurezas y se desinfectaron (hipoclorito de sodio al 5% durante 1 minuto) y aclararon con agua destilada estéril, se cortaron segmentos de aproximadamente 5mm² de las áreas con síntomas visibles y se colocaron en platos Petri con PDA. Se incubó a 25°C durante siete días. Las muestras del sustrato, se secaron y se realizó la dilución seriada (1 gr en 9 ml de agua esterilizada) hasta 1x10⁵. De cada suspensión se tomó 1 ml y se lo colocó en 9 ml de PDA, se homogenizó y añadió al plato Petri. Se incubó a 25°C en ambiente de laboratorio, durante 24 - 48 horas y se purificaron las colonias.

6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con algunos los complementos de cálculo de Excel (Microsoft Corporation, 2020), los programas estadísticos Infostat® (Di Rienzo *et al.*, 2020) y SPSS, versión 26 (IBM, 2019). Las pruebas estadísticas realizadas fueron: normalidad, análisis de varianza y para separar las medias de tratamientos, se realizó la prueba de medias de Tukey con una significación del 0,05% y la comparación de proporciones (prueba Z).

7. Diseño experimental

En el cuadro 6 se indican los factores en estudio y tratamientos para evaluar la biofortificación con *Trichoderma* spp., expresados por la variación en la altura y el diámetro de las plantas Gros Michel y Cavendish en umbráculo.

Cuadro 6. Factores de estudio para la biofortificación en umbráculo.

Factores		Descripción
Factor A	A	<i>Trichoderma harzianum</i>
	B	<i>Trichoderma asperellum</i>
	C	<i>Trichoderma virens</i>
	D	<i>T. harzianum</i> – <i>asperellum</i> – <i>virens</i>
Factor B	E	Gros Michel
	F	Cavendish
Factor C	G	Con desinfección
	H	Sin desinfección

45

Los tratamientos fueron la combinación de factor A x B x C + T, el factor A fueron las especies de *Trichoderma*, el factor B los cultivares Gros Michel y Cavendish, el factor C tratamiento con y sin desinfección. Se les sumaron dos testigos sin inoculación, con un total de 18 tratamientos (Cuadro 7). La unidad experimental correspondió a una planta, se utilizaron 10 plantas en cada tratamiento que fue repetido tres veces.

Cuadro 7. Tratamientos para la biofortificación de las vitroplantas en umbráculo.

N°	Código	Descripción
1	A + E + G	<i>Trichoderma harzianum</i> + Gros Michel + desinfección
2	A + F + G	<i>Trichoderma harzianum</i> + Cavendish + desinfección
3	B + E + G	<i>Trichoderma asperellum</i> + Gros Michel + desinfección
4	B + F + G	<i>Trichoderma asperellum</i> + Cavendish + desinfección
5	C + E + G	<i>Trichoderma virens</i> + Gros Michel + desinfección
6	C + F + G	<i>Trichoderma virens</i> + Cavendish + desinfección
7	D + E + G	<i>T. harzianum</i> – <i>T. asperellum</i> – <i>T. virens</i> + Gros Michel + desinfección
8	D + F + G	<i>T. harzianum</i> – <i>T. asperellum</i> – <i>T. virens</i> + Cavendish + desinfección
9	E + G	Testigo Gros Michel + desinfección
10	F + G	Testigo Cavendish + desinfección
11	A + E + H	<i>Trichoderma harzianum</i> + Gros Michel sin desinfección
12	A + F + H	<i>Trichoderma harzianum</i> + Cavendish sin desinfección
13	B + E + H	<i>Trichoderma asperellum</i> + Gros Michel sin desinfección
14	B + F + H	<i>Trichoderma asperellum</i> + Cavendish sin desinfección
15	C + E + H	<i>Trichoderma virens</i> + Gros Michel sin desinfección
16	C + F + H	<i>Trichoderma virens</i> + Cavendish sin desinfección
17	E	Testigo Gros Michel sin desinfección
18	F	Testigo + Cavendish sin desinfección

Para el Diseño estadístico se utilizó un arreglo factorial A x B x C + T, dispuesto en un diseño completamente al azar (DCA) con 18 tratamientos y tres repeticiones, como se indicó en el ANDEVA (Cuadro 8), la separación de media de tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey al 0,05%.

Cuadro 8. Esquema del diseño de varianza (ANDEVA) para biofortificación.

F. Variación	Desarrollo	GI
Tratamiento	(18-1)	17
Error	(18) (3-1)	36
Total	18*3-1	53

La inoculación de *Foc R1*, en las plantas biofortificadas de Gros Michel, se realizó bajo condiciones de umbráculo, los factores estudiados se detallan en el cuadro 9. Los tratamientos resultaron de la combinación de los factores de estudio (Cuadro 9). La unidad experimental correspondió a 10 plantas biofortificadas a las que se le aplicó el tratamiento correspondiente como se indica (cuadro 10). El experimento fue dispuesto en un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con 3 repeticiones, como se señala en el ANDEVA (Cuadro 11).

46

Cuadro 9. Factores de estudio de cepas de *Trichoderma* spp.

Factores	Descripción
A	<i>Trichoderma harzianum</i>
B	<i>Trichoderma asperellum</i>
C	<i>Trichoderma virens</i>
D	<i>T. harzianum</i> – <i>T. asperellum</i> – <i>T. virens</i>

Cuadro 10. Tratamientos estudiados en la inoculación de vitroplantas con *Foc*.

N°	Descripción
1	Gros Michel + <i>T. harzianum</i> + <i>Fusarium</i>
2	Gros Michel + <i>T. asperellum</i> + <i>Fusarium</i>
3	Gros Michel + <i>T. virens</i> + <i>Fusarium</i>
4	Gros Michel + <i>T. harzianum</i> – <i>T. asperellum</i> – <i>T. virens</i> + <i>Fusarium</i>
5	Testigo Gros Michel + <i>Fusarium</i>
6	Testigo Gros Michel + agua
7	Testigo Cavendish + <i>Fusarium</i>
8	Testigo Cavendish + agua

Cuadro 11. Esquema del diseño de varianza de la inoculación de vitroplantas con *Foc*.

F. Variación	Desarrollo	GI
Total	(3*8-1)	23
Tratamiento	(8-1)	7
Repetición	(3-1)	2
Error	(8-1)(3-1)	14

Resultados:

1. Bio-fortificación de vitroplantas con los aislados de *Trichoderma* spp.

1.1. Altura, peso de las plantas y volumen radicular.

El análisis de varianza para la variable altura de las vitroplantas detectó diferencias significativas entre los tratamientos (p -valor $<0,0001$). El tratamiento con el cultivar Gros Michel inoculado con *T. harzianum* y *virens* sin captan a los 12 días, presentaron

mayor valor de 66,32 y 63,25 mm respectivamente (Figura. 4), según la prueba de Tukey difiere estadísticamente del tratamiento Gros Michel inoculado con el mix de *Trichoderma* + captan que obtuvo el menor valor con 45,30 mm.

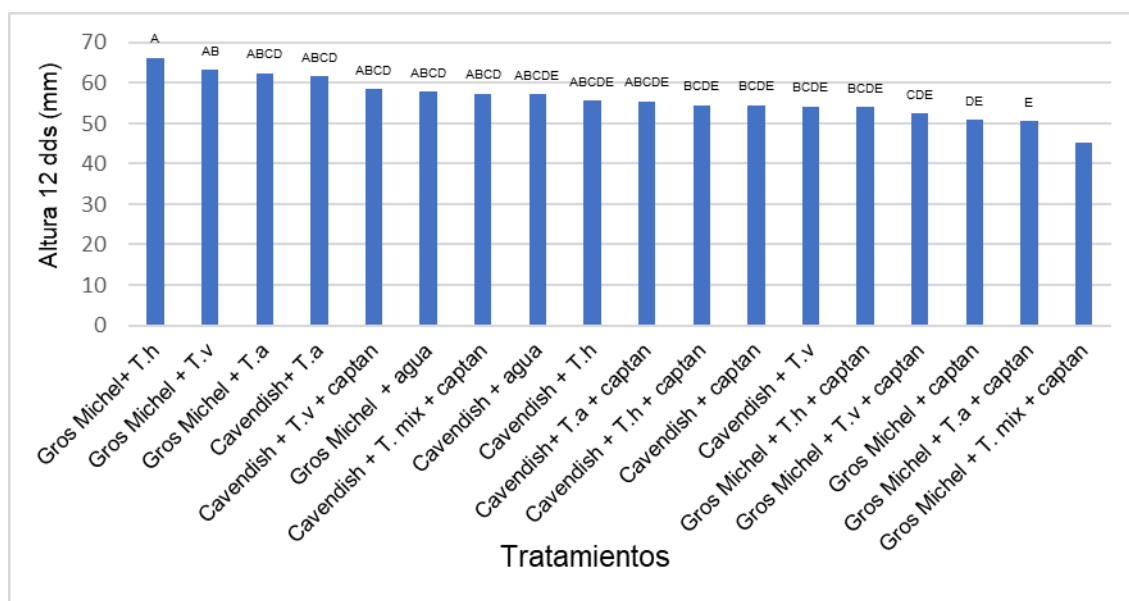


Figura 4. Promedio de la altura de las plantas a los 12 días y los rangos según la prueba de Tukey.

Al evaluar a los 26 días se detectaron diferencias altamente significativas (p-valor 0,0001), la prueba de Tukey encontró diferencias entre el tratamiento del cultivar Gros Michel, inoculado con *T. harzianum* sin captan con mayor valor 83,32 mm, al comparar los tratamientos con captan Cavendish + *T. harzianum*, Gros Michel inoculado con *Trichoderma* mix, Cavendish mix con valores en la altura de la planta 60,44; 60,43 y 60,37 mm respectivamente, el testigo Cavendish con 57,83 y Cavendish inoculado con *T. asperellum* 54,62 mm (Figura 5).

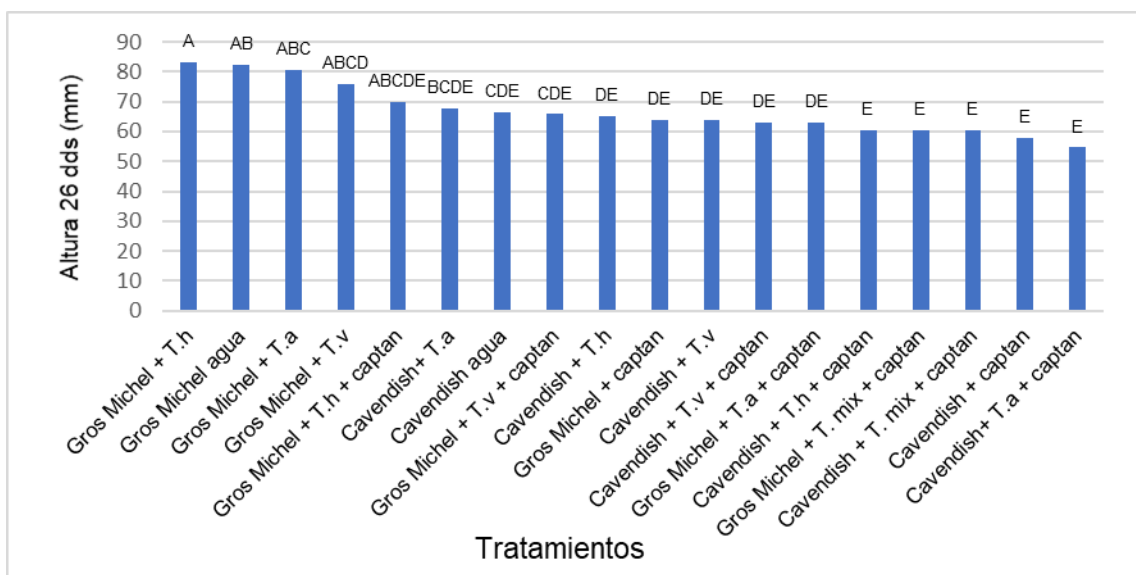


Figura 5. Promedio de la altura de las plantas a los 26 días y rangos según la prueba de Tukey.

En el diámetro del pseudotallo de la planta, los resultados del análisis de la varianza son altamente significativos (p -valor $< 0,0001$), el cultivar Cavendish en el testigo sin captan presenta valores de 4,76 mm respectivamente, lo que difiere con las plantas de Cavendish con *T. asperellum* + captan con 3,88 mm y Gros *Trichoderma* mix + captan con 3,82 del diámetro del pseudotallo (Figura 6).

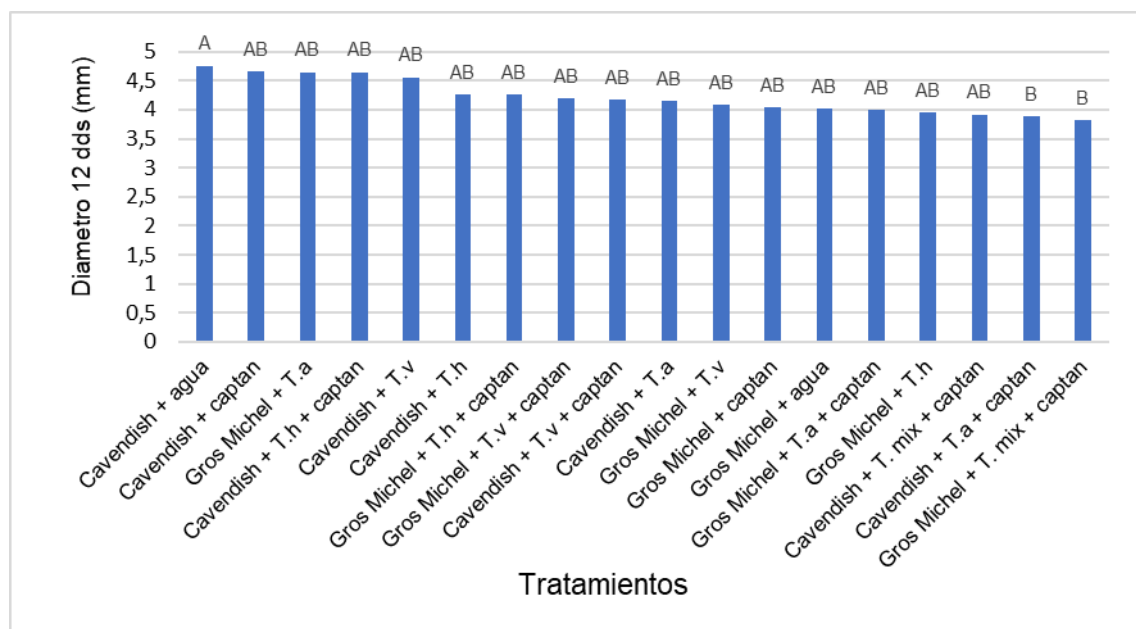


Figura 6. Promedio del diámetro (mm) de los tratamientos a los 12 días, y rangos según la prueba de Tukey.

Según el análisis de varianza para el diámetro del pseudotallo a los 26 días presentan diferencias altamente significativas (p -valor $< 0,0001$), el tratamiento que presenta mayor diámetro fue Cavendish testigo sin captan con 5,67 mm junto con Cavendish con *T. virens* sin captan con 5,63 mm, la prueba de Tukey encontró diferencias

estadísticas, el tratamiento que presentó menor diámetro fue Cavendish con *T. asperellum* + captan con 4,21 mm (Figura 7).

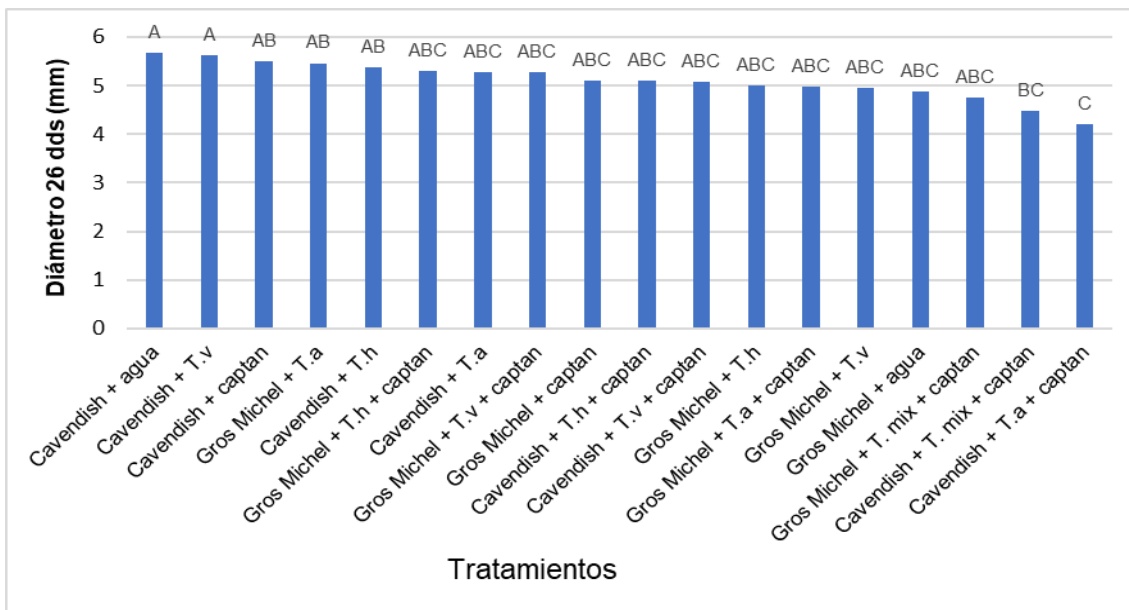


Figura 7. Promedio del diámetro de las vitroplantas a los 26 días y rangos según la prueba de Tukey.

Para el peso seco de la planta a los 30 días, el análisis de la varianza detectó diferencias altamente significativas (p -valor $<0,0001$). Por tanto, los tratamientos con mayor valor resultaron ser Cavendish + *T. harzianum* (117,00 mm) Cavendish + *T. asperellum* (113,33 mm) Cavendish + *T. vires* (107,11 mm), difieren estadísticamente según la prueba de Tukey del tratamiento Gros + *T. mix* (33,89 mm) (Figura 8).

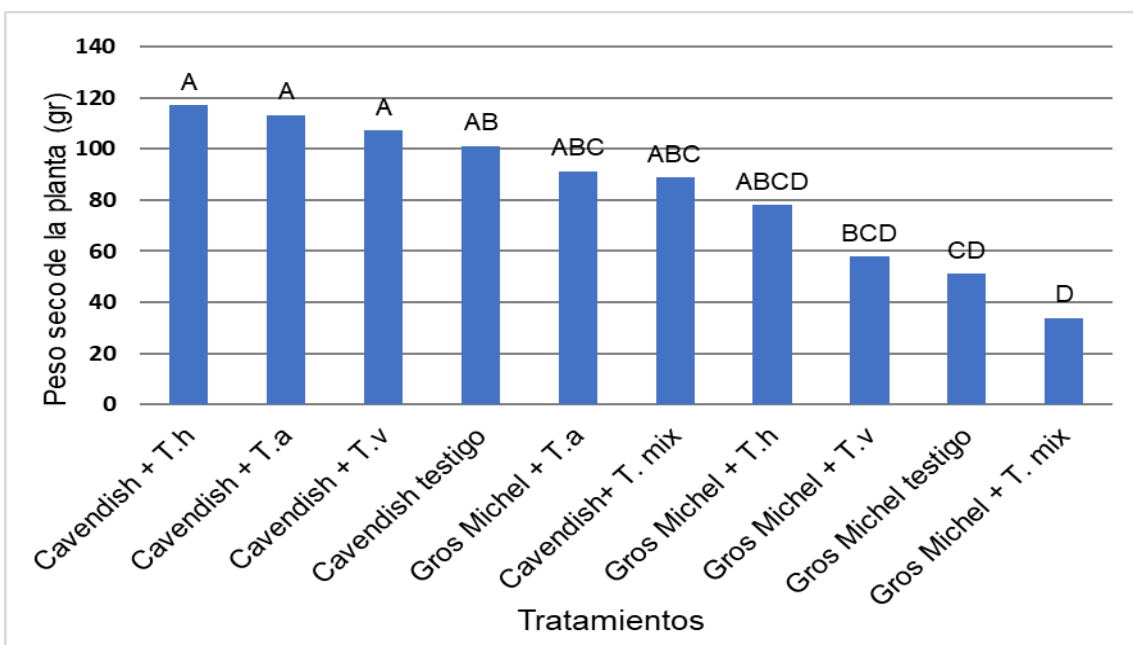


Figura 8. Peso seco (g) de las vitroplantas de Gros Michel y Cavendish inoculadas con *Trichoderma* spp. a los 30 ddi. y rango según la prueba de Tukey.

Para el peso seco de la raíz a los 30 días (Figura 9) el análisis de la varianza detectó diferencias altamente significativas para los tratamientos (p -valor $<0,0001$). Los tratamientos con los valores más altos fueron Cavendish + *T. virens* con 115,78 mm, Cavendish+ *T. mix* (107,44 mm) y Cavendish + *T. harzianum* (106,00 mm), son estadísticamente diferentes a los tratamientos Gros+ *T. mix* (37,22 mm) y Gros testigo (35,56 mm).

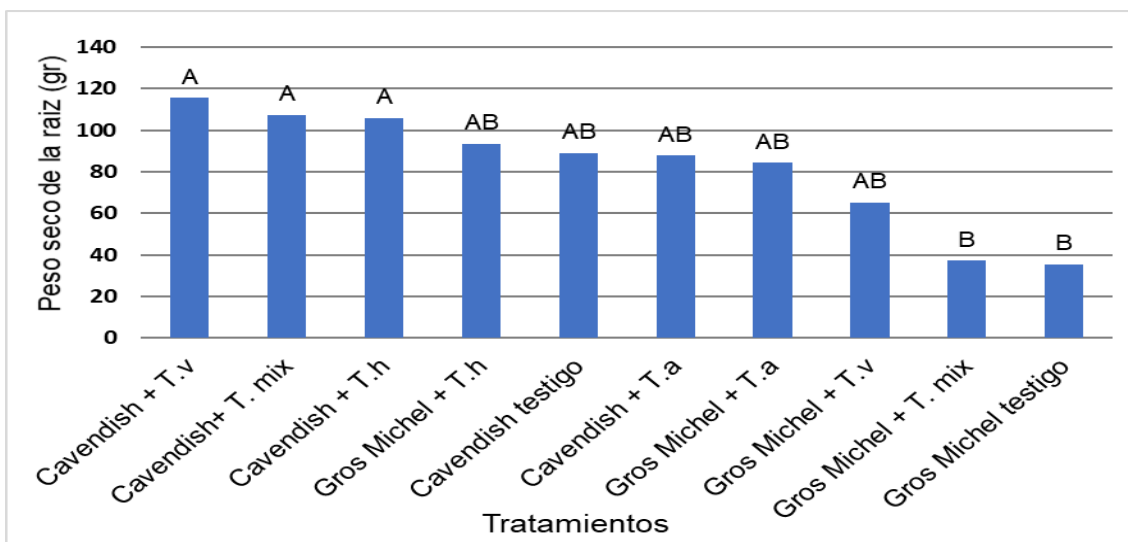


Figura 9. Valores y rango según prueba de Tukey del peso seco de la raíz de vitroplantas de Gros Michel y Cavendish inoculadas con *Trichoderma* spp. a los 30 DDI.

Para el peso seco de la planta a los 30 días (Figura 10) el análisis de la varianza detectó diferencias altamente significativas para los tratamientos (p -valor $<0,0001$). La evaluación del cultivar Cavendish + *T. harzianum*, *T. virens*, *T. asperellum* y el mix con valores de 223,00; 222,89; 201,33 y 196,33 mm respectivamente y el Cavendish testigo (190,33 mm) difieren estadísticamente del tratamiento Gros + *T. mix* (71,11 mm).

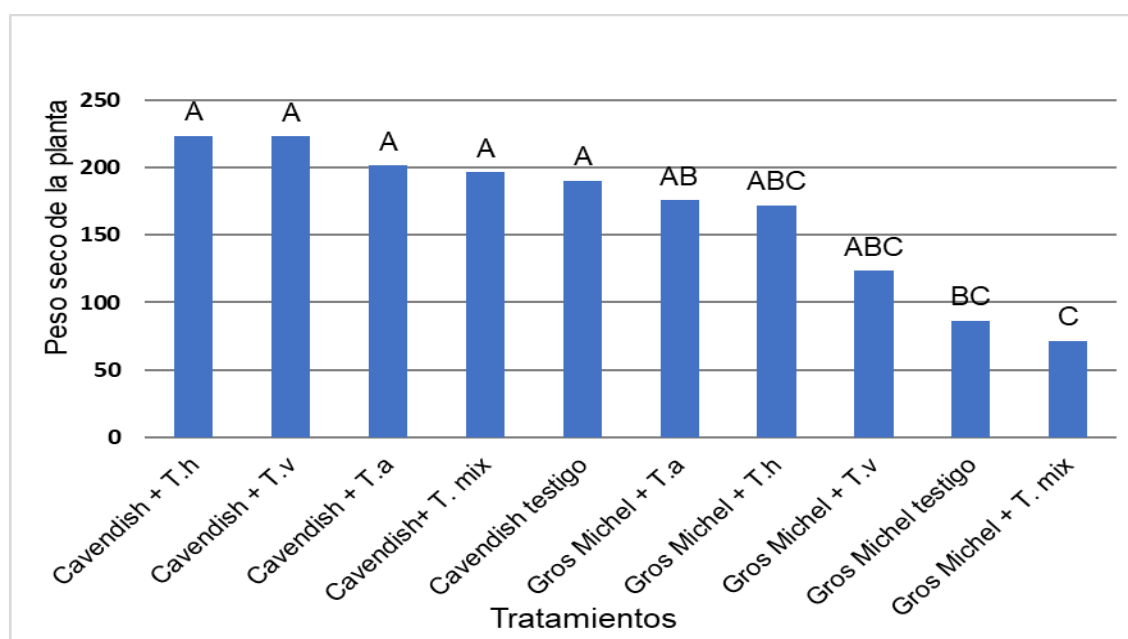


Figura 10. Promedio del peso seco total planta (g) de las vitroplantas de Gros Michel y Cavendish inoculadas con *Trichoderma* spp. a los 30 DDI y rangos según la prueba de Tukey.

El análisis de varianza para el volumen radicular mostró que existe una diferencia altamente significativa (p-valor <0,0001) los tratamientos con mayor volumen fueron Gros y Cavendish inoculados con *T. harzianum* con 0,68 ml, según la prueba de Tukey es diferente el tratamiento testigo Gros Michel con menor volumen 0,22 ml (Figura 11)

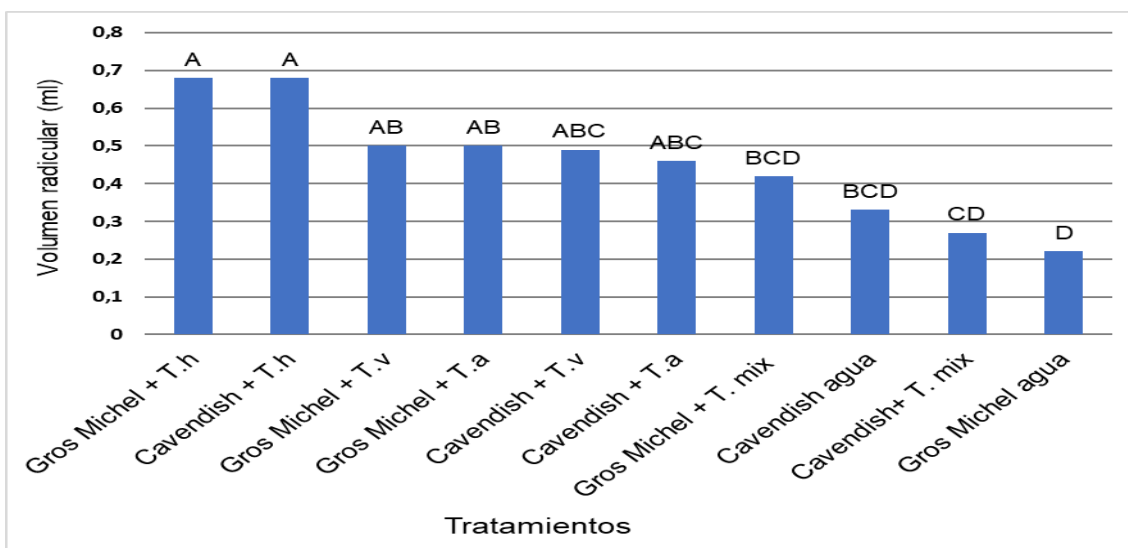


Figura 11. Volumen radicular (ml) de las vitroplantas de Gros Michel y Cavendish inoculadas con *Trichoderma* spp. (30 ddi), rango según prueba de Tukey.

1.2. Pigmentación clorofílica de las vitroplantas Gros Michel y Cavendish inoculadas con *Trichoderma* spp.

Para la pigmentación clorofílica el análisis de varianza no detectó diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor 0,0584), a los 28 días después de la siembra en bandeja, estadísticamente los tratamientos son iguales con valores que fluctúan entre 47,95 – 37,67 (Figura 12).

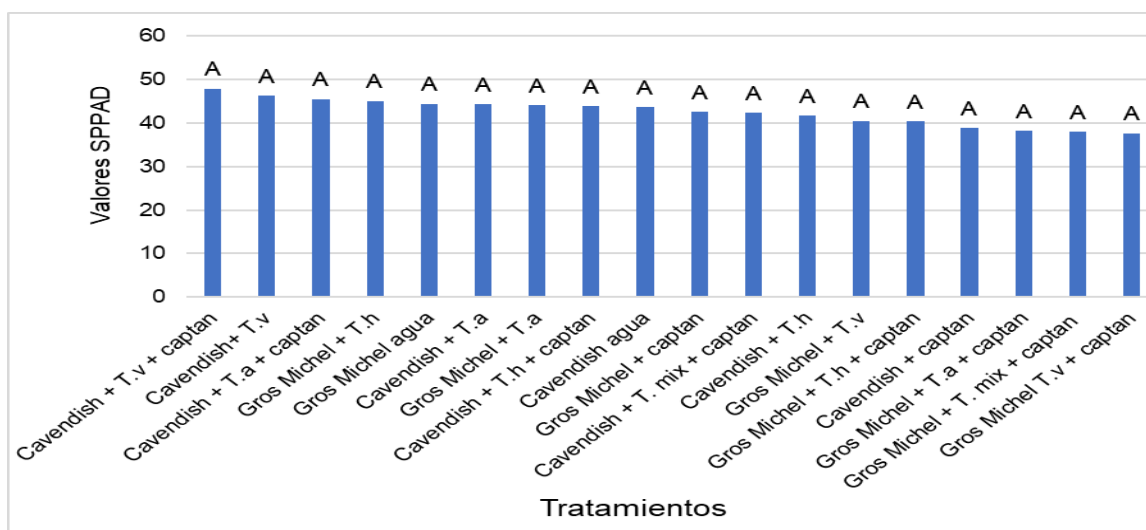


Figura 12. Promedio de los valores SPPAD de la pigmentación clorofílica en vitroplantas de Gros Michel y Cavendish inoculadas con *Trichoderma* spp.

1.3. Recuperación de *Trichoderma* spp. en las vitroplantas de banano Gros Michel y Cavendish a los 30 días después de la inoculación.

Previo a la inoculación se realizó el análisis de la carga microbiana del sustrato, no se obtuvieron colonias de *Trichoderma*, pero se observó la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* ($1,8 \times 10^5$ UFC gr⁻¹) y bacterias ($8,2 \times 10^4$ UFC gr⁻¹), estas poblaciones corresponderían a contaminantes no patogénicos. De muestras de tejido vegetal cultivado *in vitro*, se aislaron las especies *T. asperellum* y *T. virens*, que colonizaron toda la planta, *T. harzianum* solo creció de las muestras de pseudotallo y raíces. En los tratamientos con las tres especies (*T. mix*) se observó *T. asperellum* y *T. virens* en las hojas; los tres aislados en los pseudotallos y de las raíces se recuperaron *T. harzianum* y *T. virens* (Cuadro 12), en el testigo no se aislaron colonias de *Trichoderma*.

52

Cuadro 12. Recuperación de *Trichoderma* spp. en plantas de Gros Michel y Cavendish.

Cavendish y Gros Michel	Tratamientos				
	<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. virens</i>	<i>T. mix</i>	Testigo
Hoja	<i>T. asperellum</i>	No creció	<i>T. virens</i>	<i>T. asperellum</i> <i>T. virens</i>	No creció
Pseudotallo	<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. virens</i>	<i>T. asperellum</i> , <i>T. virens</i> <i>T. harzianum</i>	
Raíz	<i>T. asperellum</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>T. virens</i>	<i>T. harzianum</i> <i>T. virens</i>	

2. Bioensayo de antagonismo

2.1. Incidencia de la enfermedad en las vitroplantas de Gros Michel inoculadas con *Trichoderma* spp. y *Foc R1*

A los 16 ddi, se observaron los primeros síntomas de marchitez en los tratamientos inoculados en el cultivar Gros Michel, se detectaron diferencias altamente significativas (p-valor 0,0031). Los tratamientos inoculados con *T. asperellum*, *T. virens*, *T. harzianum* y la mezcla de las tres especies, presentaron una incidencia de *Foc R1* del 16,67 % estadísticamente no difirieron de los controles agua y cultivar Cavendish + *Foc R1* (0 %), pero sí de Gros Michel + *Foc R1* que presentó el 50 % de infección (Figura 13).

A los 25 ddi el cultivar Gros Michel inoculado con *T. harzianum* + *Foc R1*, alcanzó la mayor incidencia (26,67%), *T. asperellum* y la mezcla con 23,33% y *T. virens* mantuvo el 16,67%, mientras que el testigo Gros Michel + *Foc R1* mostró el 100% de plantas muertas. En los controles no se observaron síntomas de la enfermedad (Figura 15)

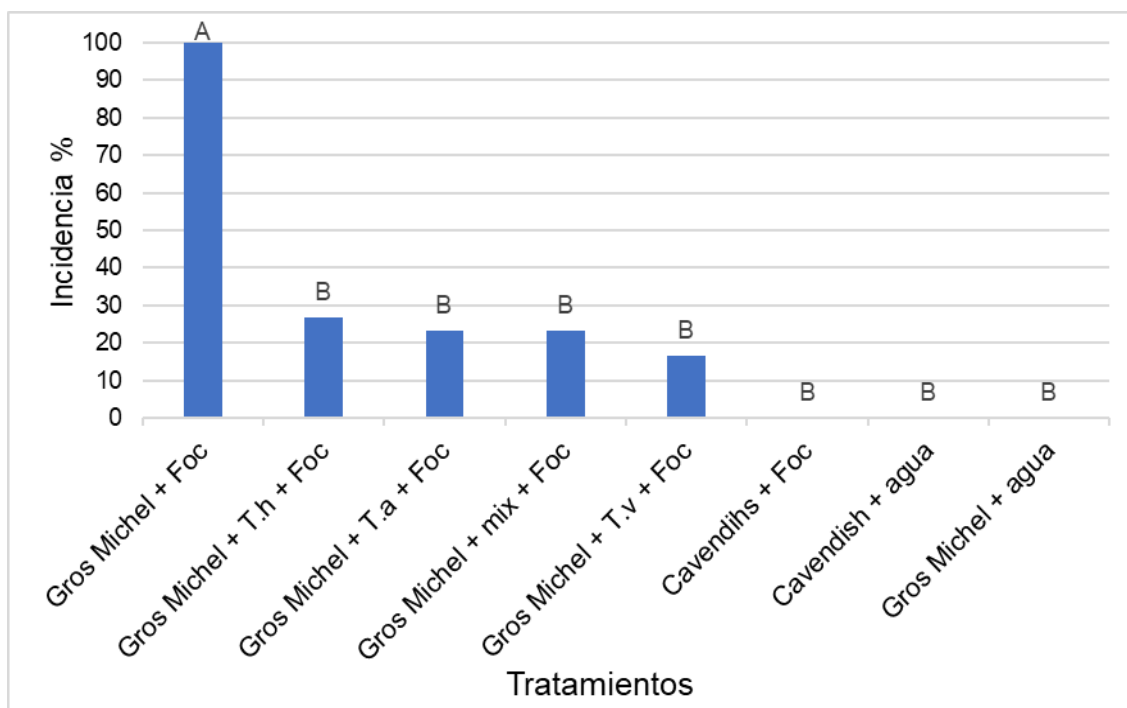


Figura 15. Porcentaje y rango según la prueba de Tukey de la incidencia de *Foc* R1 (25 ddi) en las plantas inoculadas con *Trichoderma* spp.

2.2. Severidad de la enfermedad en las vitroplantas de Gros Michel inoculadas con *Trichoderma* spp. y *Foc* R1

Según la prueba de comparación de proporciones (prueba z) se encontraron diferencias significativas para los tratamientos Gros Michel + *T. asperellum* + *Foc* R1, Gros Michel + *T. harzianum* + *Foc* R1, Gros Michel + *T. virens* + *Foc* R1, testigo Cavendish + agua, testigo Cavendish + *Foc* R1, testigo Gros Michel + agua y testigo Gros Michel + *Foc* R1 (Cuadro 13).

Los tratamientos testigo Cavendish + agua, testigo Cavendish + *Foc* R1, testigo Gros Michel + agua presentaron en mayor proporción con el 96,7 % el estado ausencia de síntomas de *Foc* R1. Por otro lado, el testigo Gros Michel + *Foc* R1 el 86,7 % presentó el estado muerte de la planta y 13,33% el estado severo amarilleamiento (clorosis) por tanto este tratamiento el 100 % presentó síntomas de la enfermedad estudiada.

Cuadro 13. Estados de la incidencia de síntomas de *Foc* R1 según las pruebas de comparación de proporciones (prueba Z).

Tratamientos		Ausencia de síntomas	Clorosis en hojas viejas	Clorosis en hojas bajas	Clorosis severa	Muerte de la planta	Total
G+mix+FocR1	Recuento	24a	2a	0a	0a	4 ^a	30
	%	80,0%	6,7%	0,0%	0,0%	13,3%	100,0%
G+T.a+FocR1	Recuento	23a	5b	0a, b	0a, b	2 ^a	30
	%	76,7%	16,7%	0,0%	0,0%	6,7%	100,0%
G+T.h+FocR1	Recuento	21a	5b, c	1c	0a, b	3 ^a	30
	%	70,0%	16,7%	3,3%	0,0%	10,0%	100,0%

G+T.v+FocR1	Recuento	25a	4a	0a, b	0a, b	1b	30
	%	83,3%	13,3%	0,0%	0,0%	3,3%	100,0%
Testigo C+ agua	Recuento	29a	0a, b	0a, b	0a, b	1b	30
	%	96,7%	0,0%	0,0%	0,0%	3,3%	100,0%
Testigo C+ FocR1	Recuento	29a	0a, b	0a, b	0a, b	1b	30
	%	96,7%	0,0%	0,0%	0,0%	3,3%	100,0%
Testigo G + agua	Recuento	29a	0a, b	0a, b	0a, b	1b	30
	%	96,7%	0,0%	0,0%	0,0%	3,3%	100,0%
Testigo G+ FocR1	Recuento	0a	0a	0a, b	4c	26b, c	30
	%	0,0%	0,0%	0,0%	13,3%	86,7%	100,0%
Total	Recuento	180	16	1	4	39	240
	%	75,0%	6,7%	0,4%	1,7%	16,3%	100,0%

G: Gros Michel; C: Cavendish; T.a: *T. asperellum*; T.h: *T. harzianum*; T.v: *T. virens*

Cada letra del subíndice denota un subconjunto de severidad categorías cuyas proporciones de columna no difieren de forma significativa entre sí en el nivel 0,05.

2.3. Producción de clorofila de las vitroplantas de Gros Michel inoculadas con *Trichoderma* spp. y Foc R1

Para la variable medición de clorofila en valores SPPAD, el análisis de varianza detectó diferencias altamente significativas entre los tratamientos con (p-valor <0,0001).

El tratamiento del cultivar Cavendish + Foc R1, que actuó como el control por la tolerancia a la enfermedad presentó el valor más alto en cuanto a la clorofila 60,11, mientras que los tratamientos de Gros Michel inoculados con *Trichoderma* y Foc R1, presentaron valores entre 57,22 - 55,48, estadísticamente difiere del control Gros + Foc R1 con menor valor SPPAD 41,52 (Figura 16).

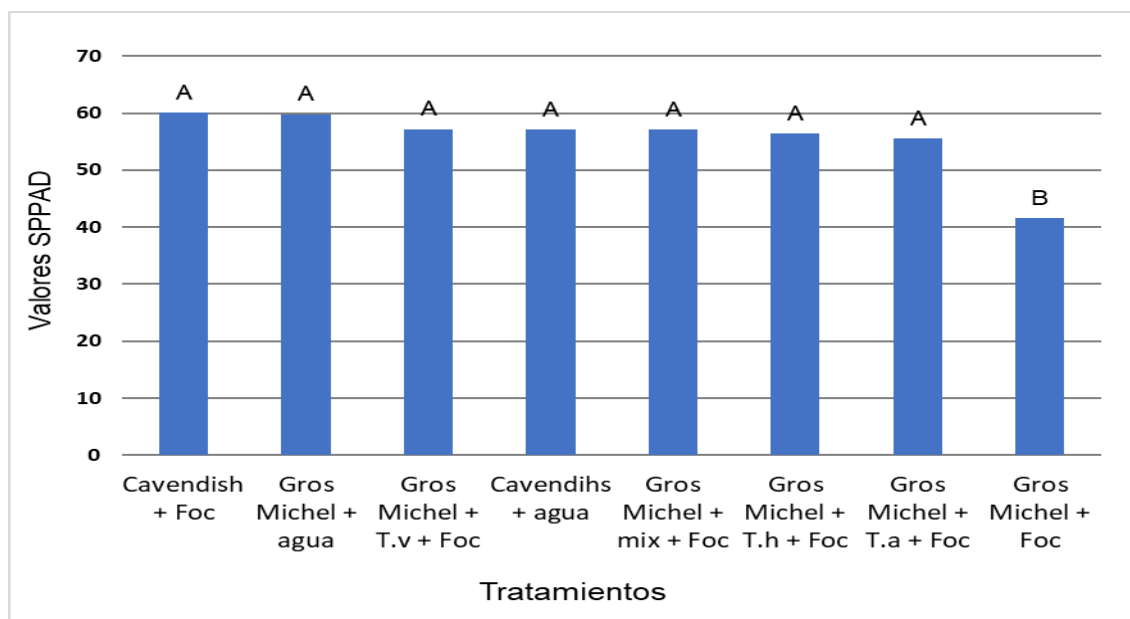


Figura 16. Promedio de los valores SPPAD para la pigmentación clorofílica en las plantas de Gros Michel inoculadas con *Trichoderma* y *Foc* R1. Rango según la prueba de Tukey (plantas de 105 días).

2.4. Altura de las vitroplantas de Gros Michel inoculadas con *Trichoderma* spp. y *Foc* R1.

El análisis de varianza detectó una diferencia altamente significativa (p -valor $<0,0001$) los tratamientos de mayor altura Gros Michel + *T. virens* + *Foc* R1 con 37,10 cm, seguido de Gros Michel + *T. asperellum* + *Foc* R1 con 36,47 cm, Gros Michel + *T. harzianum* + *Foc* R1 con 35,53 cm y el mix con 33,20 cm, los testigos presentaron menor crecimiento Gros Michel + agua 33,17 cm, Cavendish + *Foc* R1 30,70 cm y Cavendish + agua 29,87 cm, estadísticamente los tratamientos difieren del testigo Gros Michel + *Foc* R1, que presentó valores en 0 debido a que todas las plantas murieron por la enfermedad (Figura 17).

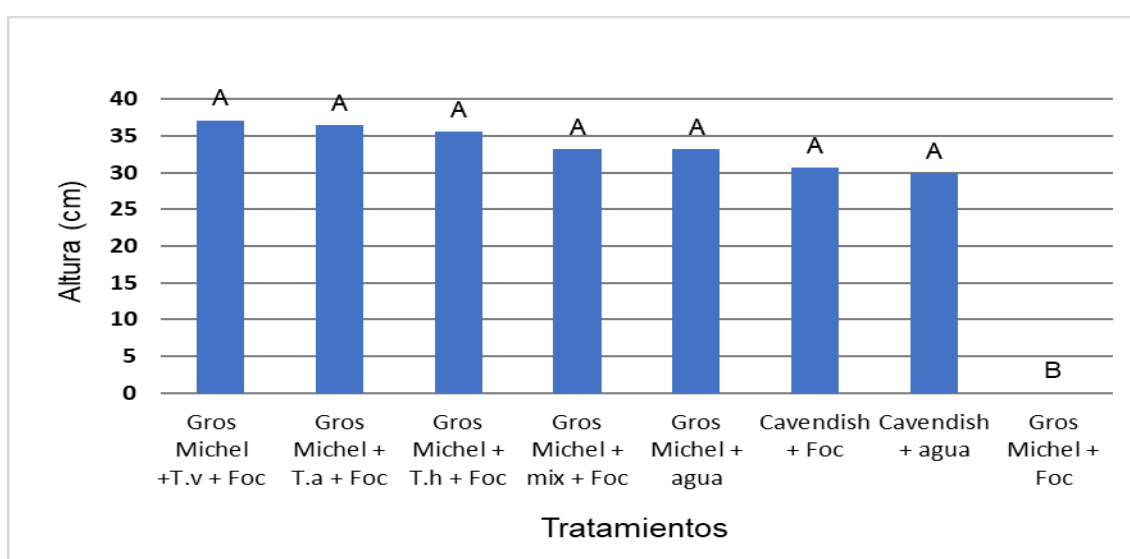


Figura 17. Promedio y rango según la prueba de Tukey para la altura de la planta (cm) cultivar Gros Michel inoculado con *Trichoderma* spp. más *Foc* R1 y cultivar Cavendish (plantas de 105 días).

2.5. Recuperación de *Foc R1* y *Trichoderma* spp.

En laboratorio se realizaron cultivos de las muestras de suelo y tejido vegetal con y sin síntomas de *Foc R1*. Los resultados mostraron la presencia de UFC de *Trichoderma* spp., en el sustrato de cada bandeja y bolsa inoculada con los tratamientos. No se recuperó *Foc R1*. En los controles sin inoculación no se observó crecimiento de *Trichoderma* (Cuadro 14). De los segmentos de tejido vegetal (pseudotallo) de plantas con síntomas de marchitez se aisló colonias de *Foc R1* y de las plantas sin síntomas se aislaron las especies de *Trichoderma* inoculadas en cada tratamiento.

56

Cuadro 14. UFC de la dilución seriada del sustrato inoculado.

Tratamiento	UFC gr ⁻¹
<i>T. asperellum</i>	8,98x10 ⁵
<i>T. harzianum</i>	3,79x10 ⁵
<i>T. virens</i>	6,16x10 ⁵
Tmix1	1,14x10 ⁵
Testigo	0
<i>Foc R1</i>	0

Conclusiones

El cultivar Gros Michel, inoculado con las especies de *Trichoderma* solo tuvo un efecto positivo en la altura, mientras que Cavendish lo tuvo en el diámetro del pseudotallo, peso seco de la planta y valores SPPAD. Ambos cultivares se beneficiaron con la biofortificación, con respecto a volumen radicular.

Se recuperaron las especies de *Trichoderma* en las raíces, pseudotallos y hojas de las vitroplantas, lo cual se considera importante para explicar el efecto de control biológico de este hongo, al exhibir competencia para ocupar estos espacios de las plantas y vivir de manera endófito, evitando o inhibiendo el crecimiento de fitopatógenos.

Las inoculaciones con las especies de *Trichoderma* tuvieron un efecto significativo en reducir la incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1.

Se mantuvieron niveles bajos de severidad de 1,3 a 1,7 (plantas con ausencia de síntomas o con amarillamientos en las hojas más viejas), mientras que el tratamiento testigo del cultivar Gros Michel inoculado con *Foc R1*, alcanzó 6, es decir la muerte de todas las plantas a los 25 DDI.

Recomendaciones:

Implementar ensayos *in vitro* utilizando otras especies antagonistas para seleccionar microorganismos con potencial de control biológico de enfermedades en banano.

Establecer ensayos de evaluación en campo en la EETP con los materiales biofortificados en esta investigación.

Referencias:

- Acuña, R.; Rouard, M.; Leiva, A.M.; Marques, C.; Olortegui, A.; Ureta, C.; Cabrera-Pintado, R. M.; Rojas, J.C.; López, D.; Cenci, A.; Cuellar, W.J.; Dita, M. (2021) First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4, causing *Fusarium* wilt in Cavendish bananas in Peru. Plant Disease, 10.1094/PDIS-09-21-1951-PDN. Advance online publication. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1951-PDN>
- Brenes, S. (2017). Parámetros de producción y calidad de los cultivares de banano FHIA-17, FHIA-25 y Yangambi. *SciELO*, 2. Obtenido de <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v28n3/43752453015.pdf>
- Chávez, A., Torres, A., Espinoza, A., Zambrano E., Villafuerte, Gonzalo., Zambrano, Elib., & Velázquez, A. (2020). Efectos de la cepa nativa de *Trichoderma* sp. y lixiviado de vermicompost bovino sobre el crecimiento foliar y contenido de clorofila en arroz (*Oryza sativa* L.) en fase de semillero. *Revista Ecuador es calidad*, 7(2). <https://doi.org/10.36331/revista.v7i2.104>.
- Cedeño, G. (2018). Banano, plátano y otras musáceas. INIAP. <http://www.iniap.gob.ec/pruebav3/banano-platano-y-otras-musaceas/>
- Chiriboga, H., Gómez, G., Y Garcés, K. (2015). Protocolos para formulación y aplicación del bioinsumo: *Trichoderma* spp. Para el control biológico de enfermedades. Paraguay: IICA.
- CNUCED INFOCOMM. (2002). Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo Banano. Publications Library. Obtenido de https://unctad.org/es/PublicationsLibrary/INFOCOMM_cp01_Banana_es.pdf
- FAO. (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Obtenido de Banana market review: <http://www.fao.org/3/ca9212en/ca9212en.pdf>
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- García, F., Pachacama, S., Jarrín, D., León, M., Ayala, M., Ortiz, H., Cevallos, G. (2020). Guía andina para el diagnóstico *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense (syn. *Fusarium odoratissimum*) agente causal de la marchitez por *Fusarium* en musáceas (plátanos y bananos). *ResearchGate*, 1-71. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/342657461_Guia_Andina_Para_el_Diagnostico_de_Fusarium_Raza_4_Tropical_RT4_Fusarium_oxysporum_f.sp_cubense_syn_Fusarium_odoratissimum_Agente_Causal_de_la_Marchitez_por_Fusarium_en_Musaceas_platanos_y_bananos
- IBM Corp. Released 2019. IBM SPSS Statistics for Windows, Versión 26.0 Armonk, NY: IBM Corp.
- Lara, D. (2009). Uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) en el cultivar Gros Michel (AAA). CATIE. Obtenido de Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza: https://agritrop.cirad.fr/556130/1/document_556130.pdf
- Monge, A. (2007). Evaluación del crecimiento y desarrollo de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) Mill y chile dulce (*Capsicum annuum*) Linn, mediante la utilización de seis sustratos y tres métodos de fertilización en el cantón de San Carlos, Costa Rica. Tesis de grado Instituto Tecnológico de Costa Rica: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/5871>.

Orjeda, G. (1998). Evaluation of *Musa* germplasm for resistance to Sigatoka diseases and Fusarium wilt. International Plant Genetic Resources Institute. <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/104250/412.pdf?sequence=7>.

Ramírez, G. (2014). Ficha técnica *Trichoderma virens*. Obtenido de: SENASA. https://repositorio.senasa.gob.pe:8443/bitstream/SENASA/260/1/2014_Gomez_Ficha-tecnica-12-T.virens.pdf

Román, J. R. (2018). Uso de hongos del género *Trichoderma* spp. como controlador de nematodos en el cultivo de banano. Tesis de grado Universidad Técnica de Machala. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/12915>

58

Romero, O., Huerta, M., Huato, M., Domínguez, F., Y Arellano, D. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Colomb. Biotecnol.*, 143-15

Wu, Q., Sun, R., Ni, M., Yu, J., Yu, C., Y Dou, K. (2007). Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *Plos one*, 1-3. Retrieved from <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0179957Ytype=printable>

Proyecto 5. Efecto de fungicidas químicos y bioestimulantes sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1 a nivel de laboratorio e invernadero.

Responsables: Ph.D. Danilo Vera C., Ing. Jacinto Daniel Pisco

Colaboradores: MSc. Iván Garzón, Dra. Karina Solis H. Mgs. Sofía Peñaherrera
Ph.D. José Ochoa

59

Antecedentes:

El banano ecuatoriano ha sido identificado por su sabor y calidad, tales propiedades hacen del Ecuador un adversario mundial en la exportación de esta fruta tropical, que durante el 2020 fue de 347'480.672 cajas (Acorbanec, 2020), representando el 40 % de las exportaciones de la región (FAO, 2020). La producción de banano es dependiente del subgrupo Cavendish (Musa AAA), esta baja diversidad genética lo hace vulnerable a la presión de plagas (Warman y Aitken, 2018), como la marchitez por *Fusarium*, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (*Foc* R1), que representa una de las enfermedades más destructivas y de importancia económica en el género *Musa* (García *et al.*, 2020). La enfermedad se considera devastadora, por las pérdidas que provocó *Foc* R1 en el cultivar Gros Michel, obligando a su reemplazo por el cultivar Cavendish, el mismo que está siendo amenazado por la variante *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical (*Foc* R4T), que es más virulenta e infecta todas a las musáceas (Liu *et al.*, 2020).

La propagación de *Foc* R4T es de gran preocupación debido al limitado conocimiento sobre aspectos principales de la epidemiología de la enfermedad y la falta de modelos de gestión (Dita *et al.*, 2018). Ciertos fungicidas químicos podrían tener la posibilidad de ejercer algún impacto sobre el patógeno (Martínez *et al.*, 2020), otra de las alternativas es el uso de los bioestimulantes para fortalecer los mecanismos de defensa de la planta. Sin embargo, se desconocen sus efectos ante el patógeno ya que no se encuentra en el país, pero es posible realizar estudios en utilizando a *Foc* R1 como modelo para tener nociones de prevención, manejo y control de este hongo. Ante lo cual, se planteó esta investigación cuyo objetivo fue estudiar el efecto de fungicidas y bioestimulantes sobre el desarrollo y crecimiento de estructuras reproductivas (microconidias, macroconidias y clamidosporas) de *Foc* R1 en laboratorio y umbráculo.

Objetivos:

1. Determinar los porcentajes de inhibición de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 producidos por fungicidas y bioestimulantes *in vitro*
2. Observar la presencia de estructuras reproductivas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 inhibido por fungicidas y bioestimulantes *in vitro*
3. Evaluar la incidencia y severidad de *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* raza 1 en plantas de banano Gros Michel tratadas con los fungicidas y bioestimulantes

Metodología:

La investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal, Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en el Km 5 vía Quevedo – El Empalme, cantón Mocache, provincia de Los Ríos.

La fase de investigación de laboratorio (Objetivo 1 y 2) se realizó durante el 2021 y la fase de vivero (Objetivo 3) se desarrollará durante el 2022.

60

1. Obtención *F. oxysporum* fs p. *ubense* raza 1

Se recolectaron muestras de planta de banano cv Gros Michel (Lote de Musáceas de la EETP, Programa de banano, plátano y otras musáceas) con síntomas de marchitez por *Fusarium* y se trasladaron al laboratorio de Fitopatología, donde se realizaron cortes longitudinales del tejido infectado e inmediatamente se lavaron para eliminar impurezas adheridas (Marqués, et al., 2013). Se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante tres minutos con agitación constante y se realizaron tres lavados con agua destilada esterilizada. Se eliminó el exceso de agua con papel filtro esterilizado y se cortaron segmentos que se colocaron en placas Petri (9cm de diámetro) conteniendo medio de cultivo PDA (Potato Dextrosa Agar) con ácido láctico al 85% (para evitar el crecimiento de bacterias), se incubó a 24°C durante siete días y se purificaron las colonias obtenidas para la identificación morfológica de *Foc* R1 a través de microscopia de luz.

2. Efecto de fungicidas y bioestimulantes en la inhibición *in vitro* de *Foc* R1

Se realizó una prueba de eficacia de fungicidas químicos y bioestimulantes, en el cuadro 15, se detallan los fungicidas y bioestimulantes utilizados con la dosis media comercial transformada a μ l (micro litros) para la evaluación *in vitro*.

Cuadro 15. Descripción de fungicidas y bioestimulantes utilizados *in vitro* con la dosis media comercial

Nombre comercial	Grupo químico/composición	Dosis
Bioestimulante ADMF	Materia orgánica 3.16% p/v Ácidos fúlvicos 4.51% p/v Aminoácidos 0.72% p/p	1250 μ l
MAXFUN	Extracto de jengibre 15% Aditivos 85%	1250 μ l
Bioestimulante BHOSTIM	Aminoácido (AA) 10.18% Materia orgánica (MO)18.31%	1250 μ l
CELEST	Fludioxionil 25rg/L	500 μ l
SKUL-27	Sulfato de cobre pentahidratado 270 gr/L	437 μ l
BANKIT	Azoxistrobin 250 gr/L	500 μ l
SEEKER	Fenpropidin 750 gr/L	750 μ l
TILT	Propiconazole 250 gr/L	500 μ l
SCORE	Difeconazole 250 gr/L	500 μ l
VOLLEY	Fenpropimorph 94.62%	937 μ l

Para evaluar la eficacia de los fungicidas y bioestimulantes en el desarrollo de *Foc R1*, se prepararon botellas con 250 ml de PDA, las cuales se esterilizaron durante 15 minutos a 121°C, se mantuvo el PDA a 50°C en baño maría para evitar inactivar el ingrediente activo de los productos químicos. En la cámara de flujo laminar, se añadió la dosis del fungicida lentamente para lograr mezclar homogéneamente con el PDA y se dispensó 20 ml de cada medio en placas Petri plásticas estériles y se dejó solidificar.

Para la preparación del medio con bioestimulantes, se realizó el mismo proceso que se siguió en la elaboración del medio de cultivo con fungicidas.

2.1. Repique de *Foc R1* en el medio de cultivo con fungicidas y bioestimulantes

Se utilizó una colonia de *Foc R1* de 10 días crecida en PDA, se cortaron con sacabocados, discos (8 mm) de micelio/PDA de la colonia y con una aguja se repicaron (disco) al centro de las placas Petri con los tratamientos de fungicidas y bioestimulantes preparados. Las placas Petri se incubaron a 24°C y se evaluó la colonización del hongo *Foc R1* en el medio de cultivo.

2.2. Variables evaluadas

2.2.1. Determinación del crecimiento radial (CR)

Se registraron datos diarios en milímetros (mm/días) para la determinación de crecimiento radial a partir del segundo día de siembra de *Foc R1* hasta que, en el testigo (PDA) el micelio del patógeno completó la placa Petri

2.2.2. Determinación del PICM (Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial)

Para la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, se utilizó la fórmula propuesta por Pandey *et al.* (1982).

$$ICM = \frac{\text{Diámetro promedio control} - \text{Diámetro promedio tratamiento}}{\text{Diámetro promedio control}} \times 100$$

2.2.3. Número de conidios

Concluido experimento, se realizó un conteo de conidios de cada colonia de *Foc R1* crecida en los tratamientos. Se añadió en cada placa 5 ml de agua destilada esterilizada y con asa Digiralsky se removió el micelio cuidadosamente para desprender los conidios, se recuperó en un vaso de precipitación estéril y se determinó la concentración mediante conteo en la cámara Neubauer (Sánchez *et al.*, 2017), con ayuda de microscopio de luz.

Las macroconidias se contaron en los cuatro recuadros exteriores de la cámara y las microconidias en cinco cuadros del recuadro central.

Para determinar el porcentaje inhibición de las esporas se aplicó la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición de esporas} = \frac{\text{Número de esporas testigo} - \text{Número de esporas tratamiento}}{\text{Número de esporas testigo}} \times 100$$

2.2.4. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental DCA, con 10 tratamientos (dosis del producto recomendada) más un testigo (PDA) y 10 unidades de evaluación por cada tratamiento.

62

2.2.5. Análisis de datos

Se utilizó el programa estadístico Infostat para procesar los datos y se analizaron mediante un ANOVA y comparación de medias a través de la prueba Duncan ($\alpha \leq 0.05$).

Resultados:

1. Efecto de fungicidas y bioestimulantes en la inhibición *in vitro* de *Foc R1*

El crecimiento de *Foc R1* registrado en mm/días (Figura 18), resaltó la diferencia que presentaron los tratamientos con fungicidas, T7 (Fenpropidin) tuvo un crecimiento micelial menor al testigo (27,2 mm), junto a T9 (Difeconazole), T10 (Fenpropimorph) y T8 (Propiconazole), que se mantuvieron con crecimiento micelial de 45 mm. El crecimiento de *Foc R1* en los bioestimulantes fue similar al testigo (PDA).

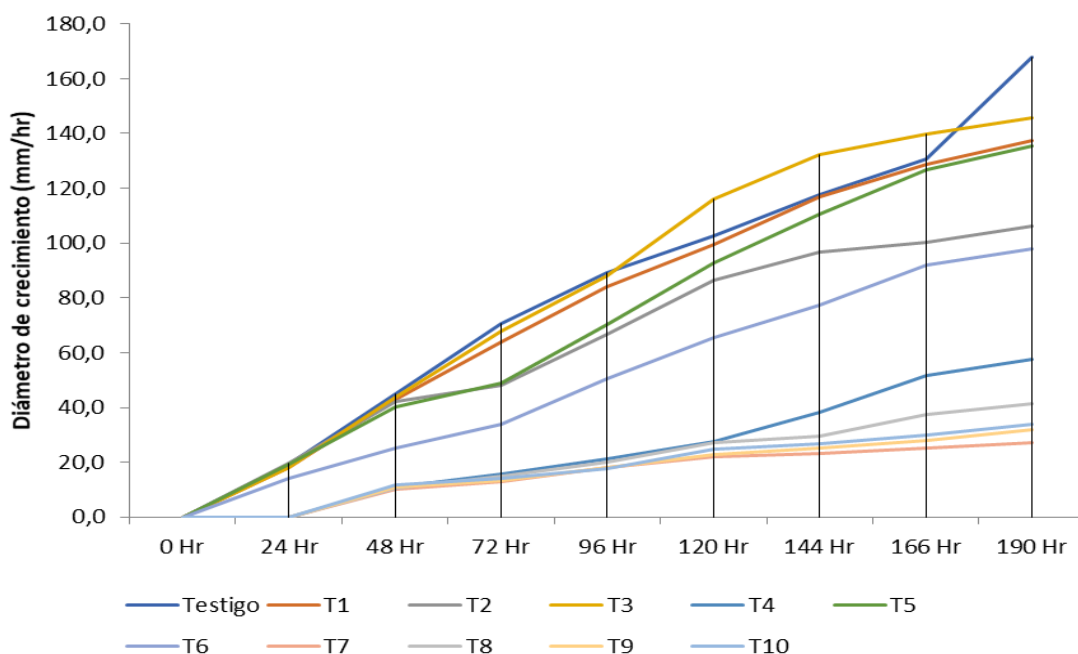


Figura 18. Crecimiento micelial de *Foc R1* cada 24 horas en medios tratados con bioestimulantes (T1: ADMF, T2: MAXFUN, T3: BIOSTIM) y fungicidas (T4: Fludioxonil, T5: Sulfato de cobre pentahidratado, T6: Azoxistrobin, T7: Fenpropidin, T8: Propiconazole, T9: Difeconazole, T10: Fenpropimorph).

El hongo *Foc R1* presentó sensibilidad en su colonización y crecimiento en el medio, tanto en los bioestimulantes como en los fungicidas (Figura 19), el crecimiento inicial es lento comparado con el testigo, a las 72 horas inicia el repunte de crecimiento tanto en los fungicidas como los bioestimulantes. En los fungicidas, *Foc R1* inicia con un crecimiento acuoso alrededor del disco sembrado, sobre esta solución acuosa, empieza a crecer y formar estructuras. Algunas excepciones como el T7 (Fenpropidin) que su crecimiento se mantuvo acuoso hasta el final de la evaluación, el T5 (Sulfato de cobre pentahidratado) presentó una coloración entre rojiza y café claro, sin presencia de micelio en el medio.

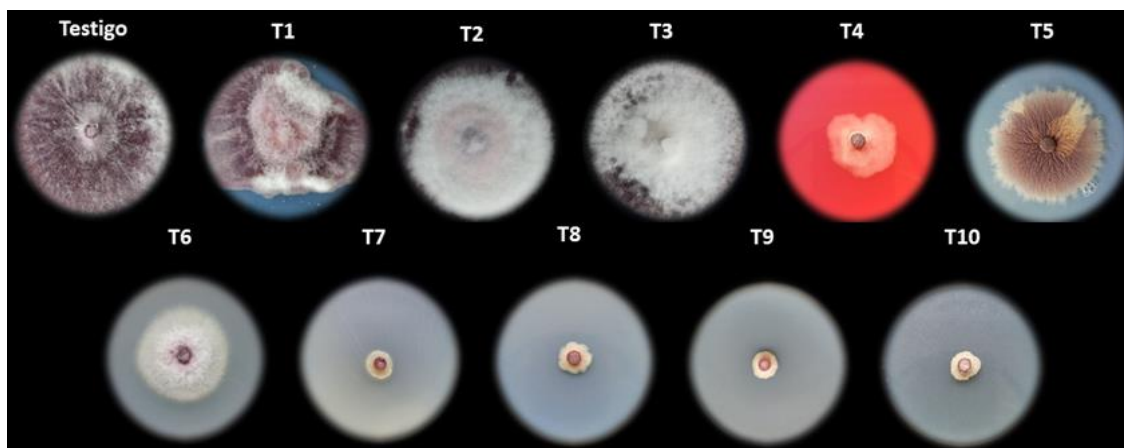


Figura 19. Efecto en el crecimiento micelial de *Foc R1* en medio PDA con bioestimulantes (T1: ADMF, T2: MAXFUN, T3: BIOSTIM) y fungicidas (T4: Fludioxonil, T5: Sulfato de cobre pentahidratado, T6: Azoxistrobin, T7: Fenpropidin, T8: Propiconazole, T9: Difeconazol, T10: Fenpropimorph).

El hongo *Foc R1* fue susceptible a los fungicidas evaluados, presentando diferencias significativas en los PICM, con la dosis media recomendada para cada producto. El tratamiento T7 (Fenpropidin) produjo el mayor PICM con un 83,81%. No obstante, los demás fungicidas solo inhibieron el hongo de manera parcial.

La tasa de crecimiento micelial acumulada de los fungicidas fue menor en comparación con el testigo (Figura 20). Los PICM de los bioestimulantes se mantuvieron por debajo del 20% de inhibición del hongo, con la excepción del T2 (MAXFUN) que inhibió un 37%, la tasa de crecimiento micelial acumulada se mantuvo siempre cerca al testigo.

2. Estructuras reproductivas de *Foc R1*

Las macroconidias y microconidias (Figura 21A-B) no se observaron en los tratamientos T5 (Sulfato de cobre pentahidratado), T7 (Fenpropidin) y T10 (Fenpropimorph). Las microconidias estuvieron presente en los tratamientos con bioestimulantes y resto de fungicidas. Además, las macroconidias no se observaron en T8 (Propiconazole) y T9 (Difeconazole).

En el T5 se observó la formación de clamidosporas sin presencia de macro o microconidias (Figura 21C).

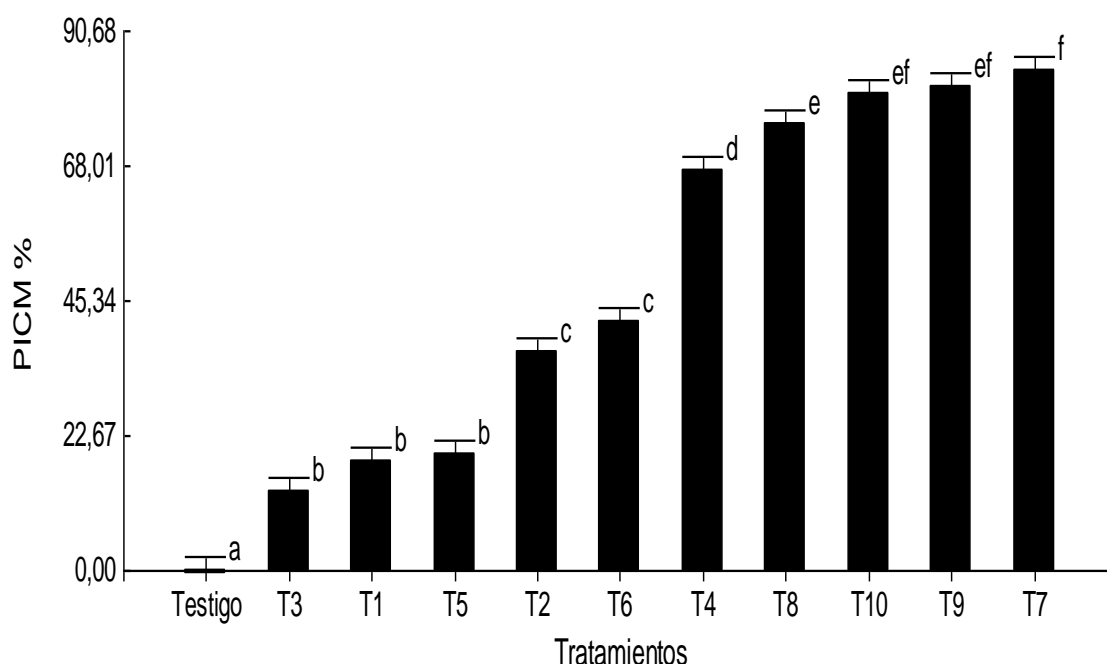


Figura 20. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Foc R1* en PDA con bioestimulantes (T1: ADMF, T2: MAXFUN, T3: BIOSTIM) y fungicidas (T4: Fludioxonil, T5: Sulfato de cobre pentahidratado, T6: Azoxistrobin, T7: Fenpropidin, T8: Propiconazole, T9: Difeconazole, T10: Fenpropimorph). Los valores corresponden a la dosis media recomendada de los productos. Las barras corresponden al error estándar. Valores con letras distintas indican diferencias significativas Duncan ($p > 0,05$).

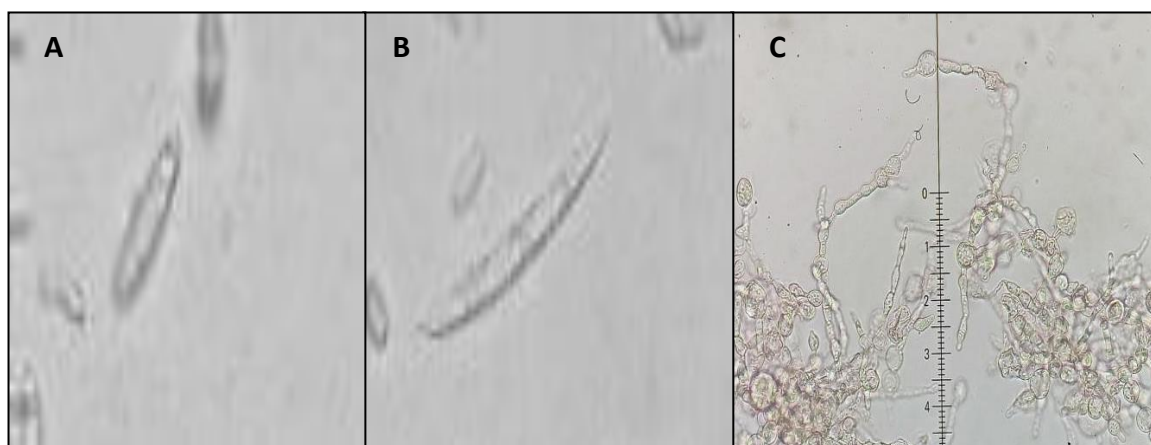


Figura 21. Estructuras reproductivas de *Foc R1*: A) Microconidias, B) Macroconidias, C) Clamidosporas.

Los tratamientos con bioestimulantes presentaron porcentaje de inhibición de microconidias entre 20 y 50%, mientras que la inhibición de las macroconidias se mantuvo del 40 al 75% de efectividad. La efectividad del 100% de inhibición de estructuras del hongo, se presentó en los tratamientos con fungicidas T5 (Sulfato de cobre pentahidratado), T7 (Fenpropidin) y T10 (Fenpropimorph) (Figura 22).

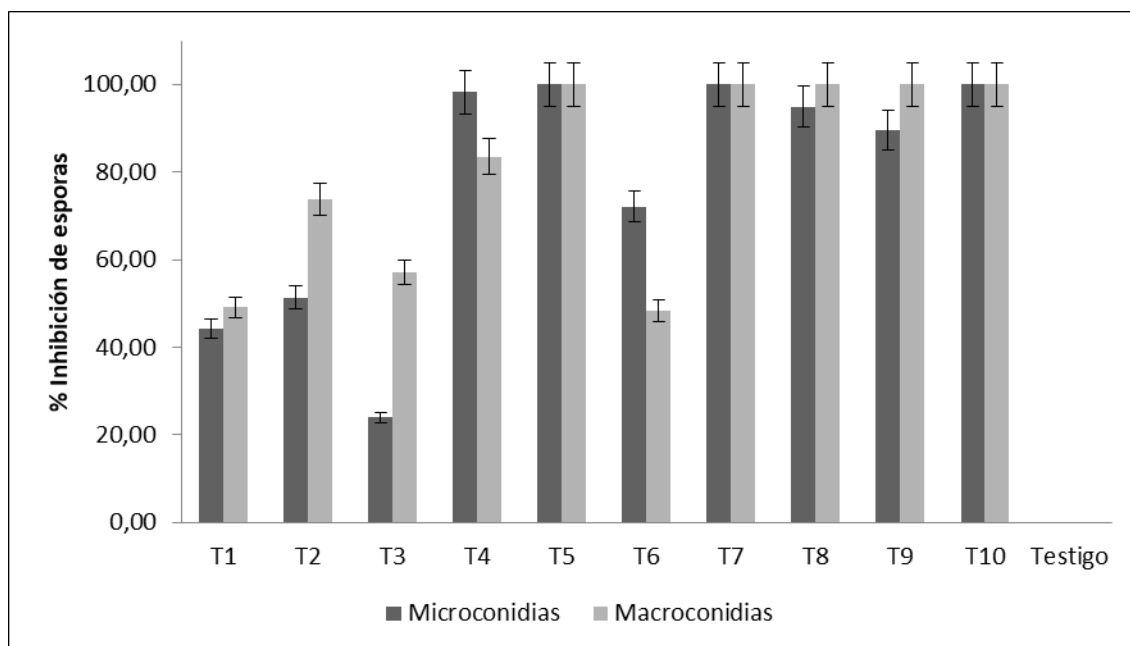


Figura 22. Porcentaje de inhibición de microconidias y macroconidias de *Foc R1* en PDA con bioestimulantes (T1: ADMF, T2: MAXFUN, T3: BIOSTIM) y fungicidas (T4: Fludioxionil, T5: Sulfato de cobre pentahidratado, T6: Azoxistrobin, T7: Fenpropidin, T8: Propiconazole, T9: Difeconazole, T10: Fenpropimorph). Las barras corresponden al error estándar.

Conclusiones

Los fungicidas fueron capaces de inhibir el crecimiento micelial de *Foc R1*. Sin embargo, los fungicidas que mostraron mayor efecto en la inhibición fueron los pertenecientes al grupo químico Fenpropidin y Difeconazole.

El fungicida Propiconazole disminuyó la velocidad de crecimiento *in vitro* de *Foc R1*, pero en el micelio del hongo se formaron estructuras reproductivas que pueden germinar y lograr que el hongo se disemine.

El sulfato de cobre pentahidratado inhibió moderadamente el desarrollo micelial de *Foc R1* e impidió la formación de micro o macroconidias, pero provocó la formación de clamidosporas (estructuras de resistencia).

Recomendación:

El trabajo se encuentra en desarrollo, se deberá continuar con la fase de vivero durante el 2022, donde se evaluará la incidencia y severidad de *Foc R1* en plantas de banana Gros Michel tratadas con los fungicidas y bioestimulantes.

Referencias:

Acorbanec, datacomex, banastat. 2020. Evolución de exportación de banana 2020.

Dita, Miguel, Marcia Barquero, Daniel Heck, Eduardo S. G. Mizubuti, y Charles P. Staver. 2018. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Frontiers in Plant Science* 9.

FAO. 2020. Análisis del mercado del banano de 2019. Roma.

García B. F. A., J. C. Quintero-Vargas, M. Ayala-Vasquez, T. Schermer, M. F. Seidl, M. Santos-Paiva, A. M. Noguera, C. Aguilera-Galvez, A. Wittenberg, R. Hofstede, A. Sørensen, y G. H. J. Kema. 2020. First Report of Fusarium Wilt Tropical Race 4 in Cavendish Bananas Caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Plant Disease* 104(3):994-994. doi: 10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN.

66

Liu, S., Jian Li, Yong Zhang, Na Liu, Altus Viljoen, Diane Mostert, Cunwu Zuo, Chunhua Hu, Fangcheng Bi, Huijun Gao, Ou Sheng, Guiming Deng, Qiaosong Yang, Tao Dong, Tongxin Dou, Ganjun Yi, Li-Jun Ma, y Chunyu Li. 2020. «Fusaric Acid Instigates the Invasion of Banana by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4». *New Phytologist* 225(2):913-29. doi: 10.1111/nph.16193.

Martínez-Solórzano, G. E., Rey-Brina, J. C., Pargas-Pichardo, R. E., & Manzanilla, E. E. (2020). Marchitez por Fusarium raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano. *Agronomía Mesoamericana* 31(1), 259-276.

Pandey, M. B.; Talpada, P. M.; Patel, B. H.; Shukla, P. C. 1982. Utilization of processed Babul seed in the ration of Kankrej bullocks for maintenance. *Indian J. Dairy Sci.* 35(4):613-615.

Sánchez, E. P., Núñez, D., Cruz, R. O., Torres, M. A., & Herrera, E. V. 2017. Simulación y conteo de unidades formadoras de colonias. *ReCIBE. Revista electrónica de Computación, Informática, Biomédica y Electrónica*, 6(1):97-111.

Warman, Noeleen M., E. A. B. Aitken. 2018. The Movement of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Sub-Tropical Race 4) in Susceptible Cultivars of Banana. *Frontiers in Plant Science* 9.