

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA E
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA MEJORAR
LA PRODUCCIÓN Y CONSERVACIÓN DE *Beauveria bassiana* Y
Trichoderma harzianum COMO APOORTE A LOS PRODUCTORES DE
CAFÉ ORGÁNICO DE LA ASOCIACIÓN “RÍO INTAG”, CANTÓN
COTACACHI.**

AUTORES:

**GISELA PAULINA NOBOA GUERRA
ALEX DAVID QUELAL GUERRERO**

DIRECTORA:

LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN

Quito, mayo del 2015

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DEL USO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaramos que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de los autores.

Quito, mayo del 2015

Gisela Paulina Noboa Guerra

CC: 1003506928

Alex David Quelal Guerrero

CC: 1720301603

DEDICATORIA

A Dios, por el don de la vida.

A mis queridos Padres Marcelo y Violeta, por todo su amor, trabajo y sacrificios.

Gisela Paulina Noboa Guerra

A Dios, por haberme dado la vida.

A mis padres y hermano por su apoyo incondicional.

A mi familia por su amor, respaldo y confianza que me brindaron.

Alex David Quelal Guerrero

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal de la AACRI (Asociación Agroartesanal de Caficultores “Río Intag), por habernos abierto las puertas de su asociación para realizar nuestro trabajo.

Al Ing. José Cueva y a la Ing. Johana Carcelén, por brindarnos su amistad y conocimiento para alcanzar nuestro objetivo.

A la Universidad Politécnica Salesiana, a nuestra tutora de tesis Msc. Laura Huachi, por su amistad, tiempo y guía en el desarrollo de nuestro trabajo de titulación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1.....	
MARCO TEÓRICO	5
1.1 Zona de Intag.....	5
1.2 Características geográficas, morfológicas y ambientales de Intag.....	5
1.3 Asociación de caficultores “Río Intag” - Apuela.....	5
1.4 Café	6
1.4.1 Clasificación taxonómica	6
1.5 Cafés especiales en el Ecuador	7
1.5.1 Café orgánico	7
1.5.2 Normativa general para promover y regular la producción orgánica- ecológica-biológica en el Ecuador	7
1.5.2.1 Norma para producción orgánica de café arábigo.....	9
1.6 Plagas y enfermedades del café.....	10
1.6.1 La Broca	11
1.6.1.1 Morfología	11
1.6.1.2 Ciclo de vida y reproducción	12
1.6.2 <i>Fusarium oxysporum</i>	12
1.6.2.1 Morfología	12
1.6.2.2 Ciclo de vida y reproducción	13
1.7 Control biológico	14
1.7.1 Estrategias de control biológico	15
1.7.2 Importancia del control biológico	16
1.7.3 Hongos entomopatógenos	16
1.7.3.1 <i>Beauveria bassiana</i>	17
1.7.3.2 Taxonomía.....	17
1.7.3.3 Morfología	18
1.7.3.4 Condiciones de crecimiento	19
1.7.3.5 Mecanismo de acción	19
1.7.3.6 Principales insectos blanco de <i>Beauveria bassiana</i>	21
1.7.3.7 Bioensayos con <i>Beauveria bassiana</i>	21

1.7.4 Hongos antagonistas	22
1.7.4.1 <i>Trichoderma harzianum</i>	22
1.7.4.2 Clasificación taxonómica	22
1.7.4.3 Morfología	23
1.7.4.4 Condiciones de crecimiento	25
1.7.4.5 Mecanismos de acción	25
1.7.4.6 Principales fitopatógenos blanco de <i>Trichoderma harzianum</i>	27
1.7.4.7 Pruebas de antagonismo	27
1.8 Producción de hongos antagonistas y entomopatógenos	28
1.8.1 Producción semi-industrial.....	28
1.8.1.1 Etapa de cepario	28
1.8.1.2 Etapa de producción.....	29
1.9 Almacenamiento del producto	33
1.10 Conservación.....	33
1.10.1 Conservación en sílica gel.....	33
1.10.2 Conservación en aceite mineral	34
1.11 Control de calidad	34
1.12 Protocolo de laboratorio	34

CAPÍTULO 2.....

MARCO METODOLÓGICO	36
2.1 Características del área de estudio	36
2.2 Metodología	36
2.2.1 Fase de campo	37
2.2.1.1 Materiales, equipos y reactivos	37
2.2.1.2 Recolección de la Broca del Café (<i>Hypothenemus hampei</i>).....	37
2.2.1.3 Recolección de (<i>Fusarium oxysporum</i>)	37
2.2.2 Fase de laboratorio	38
2.2.2.1 Materiales, equipos y reactivos	38
2.2.2.2 Etapa de diagnóstico	40
2.2.2.3 Etapa de producción.....	42
2.2.2.4 Etapa de formulación y empaque	46
2.2.2.5 Etapa de conservación.....	47

CAPÍTULO 3.....	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1 Fase I: Diagnóstico de la infraestructura, materiales, equipos y procesos de producción y conservación de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> , en el laboratorio de la AACRI.	49
3.1.1 Inspección y equipamiento del laboratorio de la AACRI	49
3.1.2 Activación de la virulencia de <i>Beauveria bassiana</i>	52
3.1.3 Activación de la virulencia de <i>Trichoderma harzianum</i>	54
3.2 Fase II: Selección del método de producción y conservación para <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>	58
3.2.1 Producción de <i>Beauveria bassiana</i>	58
3.2.2 Producción de <i>Trichoderma harzianum</i>	61
3.2.3 Implementación de mejoras del proceso de producción de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> de la AACRI.....	64
3.2.4 Conservación de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>	67
3.2.4.1 Conservación en sílica gel de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>	68
3.2.4.2 Conservación en aceite mineral de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>	69
3.3 Fase III: Redacción del protocolo de producción y conservación.	70
3.3.1 Detalle del proceso de producción de <i>Beauveria bassiana</i>	72
3.3.2 Detalle del proceso de producción de <i>Trichoderma harzianum</i>	79
3.3.3 Protocolo de conservación en sílica gel de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Trichoderma harzianum</i>	80
3.4 Fase IV: Socialización con los miembros de la AACRI sobre el buen uso de este protocolo.	81
CONCLUSIONES.....	83
RECOMENDACIONES.....	85
GLOSARIO	86
LISTA DE REFERENCIAS	89
ANEXOS.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. Descripción capitular de la normativa general para promover y regular la producción orgánica-ecológica-biológica en el Ecuador.....	8
Tabla 2. Principales plagas y enfermedades del café.....	10
Tabla 3. Condiciones de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	19
Tabla 4. Principales especies de <i>Trichoderma</i> spp.....	23
Tabla 5. Condiciones de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i>	25
Tabla 6. Escala para la medición de antagonismo (Escala de Bell).....	27
Tabla 7. Características nutricionales de los sustratos en estudio.....	30
Tabla 8. Tipos y descripción de las principales formulaciones de hongos.....	32
Tabla 9. Composición de sustratos a utilizar (Tratamientos).....	44
Tabla 10. Formato de registro de conteos.....	46
Tabla 11. Medición por siete días de los halos de crecimiento en el diámetro polar y ecuatorial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> sometidos a la prueba de antagonismo por disco dual.....	56
Tabla 12. Promedio de la concentración de esporas por gramo de sustrato de los cuatro tratamientos con <i>Beauveria bassiana</i>	59
Tabla 13. Promedio de la concentración de esporas por gramo de sustrato de los cuatro tratamientos con <i>Trichoderma harzianum</i>	62
Tabla 14. Tubos en conservación por tres meses.....	67
Tabla 15. Protocolo de producción de <i>Beauveria bassiana</i>	71
Tabla 16. Protocolo de producción de <i>Trichoderma harzianum</i>	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estado de desarrollo de <i>Hypothenemus hampei</i>	11
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Fusarium</i> spp.....	14
Figura 3. Estructura microscópica de <i>Beauveria bassiana</i>	18
Figura 4. Estructura microscópica de <i>Trichoderma harzianum</i>	24
Figura 5. Ubicación del laboratorio AACRI en Apuela, zona de Intag.....	36
Figura 6. Técnica microbiológica de estriado.....	43
Figura 7. Adecuación e implementación de áreas y equipos en el Laboratorio de la AACRI.....	49
Figura 8. Esporulación de <i>Beauveria bassiana</i> en brocas.....	52
Figura 9. Prueba de antagonismo por disco dual entre <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	54
Figura 10. Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> en cuatro diferentes sustratos.....	58
Figura 11. Promedio del recuento de esporas/gramo de sustrato de cada tratamiento con <i>Beauveria bassiana</i>	60
Figura 12. Crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en cuatro diferentes sustratos.....	61
Figura 13. Promedio del recuento de esporas/gramo de sustrato de cada tratamiento con <i>Trichoderma harzianum</i>	63
Figura 14. Comparación de los métodos de producción de la AACRI con el protocolo implementado.....	64
Figura 15. Reactivación después de tres meses de conservadas las cepas.....	68
Figura 16. Esporulación después de tres meses conservadas las cepas.....	69
Figura 17. Capacitación a los técnicos encargados de la producción y conservación de microorganismos en el Laboratorio de la AACRI.....	81
Figura 18. Socialización del protocolo con el directorio de la AACRI.....	82

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha de producción de microorganismos.....	95
Anexo 2. Fotos de la recolección de la broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i>).....	96
Anexo 3. Fotos de la recolección de plantas de babaco infectadas con (<i>Fusarium oxysporum</i>).....	97
Anexo 4. Proceso de producción de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Trichoderma harzianum</i> de la AACRI.....	98
Anexo 5. Medios de enriquecimiento y sus componentes.....	101
Anexo 6. Conteo de esporas en cámara de Neubauer.....	102
Anexo 7. Fotos de la reactivación de la virulencia de <i>Beauveria bassiana</i> (Bioensayo).....	103
Anexo 8. Aislamiento del hongo fitopatógeno (<i>Fusarium oxysporum</i>).....	104
Anexo 9. Fotos de la prueba de antagonismo de <i>Trichoderma harzianum</i> vs <i>Fusarium oxysporum</i>	106
Anexo 10. Foto de la formación del inóculo.....	108
Anexo 11. Fotos del enfundado de tratamientos.....	119
Anexo 12. Fotos de la inoculación e incubación de los tratamientos.....	110
Anexo 13. Fotos del secado de los tratamientos.....	111
Anexo 14. Fotos de la formulación del producto.....	112
Anexo 15. Fotos de la conservación de sílica gel.....	114
Anexo 16. Fotos de la conservación en aceite mineral.....	115
Anexo 17. Plano del Laboratorio de la AACRI.....	116
Anexo 18. Normas de bioseguridad para un laboratorio nivel 2.....	118
Anexo 19. Porcentaje del promedio de los halos de crecimiento en el diámetro polar y ecuatorial de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> medidos en centímetros durante 7 días.....	120

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue el diseño e implementación de un Protocolo para mejorar la Producción y Conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* en la AACRI (Asociación Agroartesanal de Caficultores “Río Intag”), como un aporte a los caficultores de la zona de Intag. Para iniciar con el trabajo se realizó un diagnóstico del laboratorio, en el cual se evidenció la falta de materiales, equipos y procedimientos documentados; que permitan el desarrollo y obtención de una formulación de calidad para cada hongo.

Así mismo se evaluó la virulencia de los hongos con los que se trabajó, mediante bioensayos con brocas y pruebas de antagonismo con *Fusarium oxysporum* para *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, respectivamente.

Las cepas activadas se sometieron a diferentes tratamientos. Resultando el mejor sustrato para *Beauveria bassiana*, T0 (Arroz 100%) con un promedio de $1,43 \times 10^8$ ufc/g y para *Trichoderma harzianum*, T3 (Arroz 80% y Bagazo 20%) con $2,41 \times 10^8$ ufc/g. Además se conservaron por dos métodos, conservación en aceite mineral y en sílica gel. El método de conservación elegido para los hongos fue el de Sílica gel ya que mantuvo valores similares de concentración (ufc/g), a los obtenidos en la etapa de producción.

La adecuación de áreas, implementación de equipos, capacitación del personal, la redacción del protocolo en base a los resultados obtenidos en todas las pruebas y su socialización con los miembros de la AACRI, permitió la implementación del mismo mejorando el proceso productivo de los hongos e incorporando una formulación básica para aumentar la vida en percha del producto. Todo esto mejoró la calidad del producto, la condición y manejo del laboratorio.

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana*, protocolo de producción y conservación.

ABSTRACT

The aim of this work was the design and implementation of a protocol to improve the production and conservation of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum* at AACRI (“Río Intag” grower’s Agroartesanal association), as a contribution to coffee producers in Intag. To initiate the work, was a diagnosis of laboratory in which the lack of materials, equipment and documented procedures that enable the development and production of a quality formulation for each fungus was evident.

In addition, the virulence of fungus was value by drills bioassays and antagonism tests with *Fusarium oxysporum*, to *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum*, respectively.

Activated strains were subject to different treatments. Resulting in the best substrate for *Beauveria bassiana*, T0 (Rice 100%) 1,43x10⁸ averaging cfu / g, for *Trichoderma harzianum*, T3 (80% rice 20% bagasse) with 2,41x10⁸ cfu / g. Besides were conserve by two methods, preservation in mineral oil and silica gel. Preservation method chosen for fungi was silica gel, it keeps a similar values of concentration (cfu / g), than obtained in the production stage.

The adequacy of areas, implementation of equipment, staff training, writing the protocol based on the results of all tests and socializing with AACRI members, allowed its implementation, improving the fungi production process and incorporating a basic formulation to increase the hanger product life. All of this enhanced product quality, condition and laboratory management.

Key words: *Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana*, production and conservation protocol.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las enfermedades de plantas generalmente se controlan con fungicidas químicos, los cuales se aplican al suelo, semillas, follaje y fruto. Las consecuencias negativas sobre la salud, la contaminación del ambiente, la residualidad y el desarrollo de resistencia, ha generado la búsqueda de alternativas de reemplazo con la incorporación de agentes biológicos. El control biológico (CB) utiliza organismos vivos; involucra también microorganismos, cuya actividad biológica disminuye el daño causado por los patógenos de las plantas. Debido a este antagonismo se logra reducir o eliminar la incidencia del fitopatógeno. Independientemente de su actividad, un agente de biocontrol eficaz debe tener la capacidad de sobrevivir en el hábitat donde es aplicado.

El enfoque de la AACRI (Asociación Agroartesanal de Caficultores “Río Intag”) es mejorar la producción y la calidad de su café. A través de ayuda técnica y educación, llegan al productor para intentar cambiar la imagen del cultivo del café e introducirla en la de los cafés especiales del país. La producción del café orgánico y comercio justo han brindado a los caficultores otra forma de economía y sociedad, donde ellos son los protagonistas de su propio desarrollo y bienestar. Para ello los caficultores deben implementar un control biológico y cultural a sus cafetales.

El laboratorio de microbiología de la AACRI ha desarrollado bioinsumos, sustratos y la producción de hongos benéficos como *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, para mantenerse en los estándares de calidad requeridos para la categoría de café orgánico.

Sin embargo las cepas con el paso del tiempo van disminuyendo su capacidad virulenta y su producción se torna difícil, por el aumento de agentes contaminantes especialmente durante la fase de incubación. Este desgaste también es notorio a nivel de campo ya que la poca efectividad de las cepas permite que la plaga se siga desarrollando y enfermando los cultivos.

El desarrollo de un protocolo general de activación, producción, conservación y formulación para *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* asegura la

virulencia de estos hongos y su capacidad controladora en el campo. La adecuación de áreas y equipos ayuda a disminuir la contaminación de los sustratos. Además de entregar un producto de calidad a todos sus socios, permitiendo a la asociación ampliar su rango de ventas a otros sectores y cultivos.

Objetivos

Objetivo general

Diseñar e implementar un protocolo para el mejoramiento de la producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*.

Objetivos específicos

- Diagnosticar el estado actual de los procesos de producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, en el laboratorio de la AACRI.
- Establecer el método más adecuado de producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* de acuerdo a las condiciones de la zona.
- Redactar el protocolo de producción y conservación.
- Socializar con los miembros de la AACRI el buen uso de este protocolo.

Justificación

La AACRI (Asociación Agroartesanal de Caficultores “Río Intag”) es una agrupación campesina, de más de 300 familias, que coordina experiencias de producción agroartesanal y comercialización. El principal producto de la AACRI es el Café “RIO INTAG”, el cual cuenta desde el 2007 con una certificación emitida por la certificadora alemana BCS (BCS ÖKO-GARANTIE) y el sello de comercio justo (Fair Trade), lo que le da valor agregado al producto dentro del mercado. El Café es exportado a países como Francia, España, Canadá y Japón desde la provincia de Imbabura (Diario La Hora, 2008, pág. 1). Todo esto se da gracias a la biodiversidad adaptada a cultivos cafetaleros y al manejo orgánico que se realiza, contribuyendo a conservar el hábitat de la zona.

En este proceso, se utilizan métodos naturales de control de plagas y enfermedades como el “cultural” y “biológico” que garantizan la producción y la calidad del grano. El control biológico consiste en usar insectos o microorganismos benéficos como *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, el primero es enemigo natural de las plagas del Café (Universidad de Cantabria, 2010, pág. 8), como la broca (*Hypothenemus hampei*), principal causante del daño a cafetos y disminución de la producción. Y el segundo es uno de los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos. (Rey, Delgado, Rincón, Limón, & Benítez, 2000, pág. 31). El control cultural es un control preventivo, el cual se realiza principalmente con la incorporación de materia orgánica al suelo. Un suelo rico en materia orgánica contiene un gran número de microorganismos benéficos que controlan a nemátodos y enfermedades, logrando un desarrollo adecuado de la planta. (Santamarina, 2007, pág. 1)

La AACRI (Asociación Agroartesanal de Caficultores “Río Intag”), cuenta con un laboratorio implementado con los equipos y áreas necesarias para el trabajo con microorganismos, además posee un cepario de *Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum* entre otros microorganismos benéficos; sin embargo en la actualidad están siendo subutilizados, por el limitado mercado al que llegan; así como, por la inexistencia de pruebas que aseguren una buena capacidad infectiva y viabilidad de las cepas. El protocolo a desarrollarse se ha limitado a *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, ya que poseen características como agentes biocontroladores, por su alto poder patogénico (Gato, 2010, pág. 189). El diseño del mismo pretende obtener un producto de calidad mediante la optimización de recursos y la mejora continua de los métodos de producción y conservación. Convirtiéndose también en una herramienta encaminada hacia la producción orgánica sostenible de cafetales en la zona de Intag.

Hipótesis

Hipótesis alternativa

El diseño e implementación de un protocolo de producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* contribuye a la producción de café orgánico de la AACRI.

Hipótesis nula

El diseño e implementación de un protocolo de producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* no contribuye a la producción de café orgánico de la AACRI.

Variables

Variable independiente

Diseño e implementación de un protocolo para la producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*.

Variable dependiente

Número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*.

Variables intervinientes

- Sustrato (aspectos nutricionales)
- Tiempo de crecimiento
- Activación de cepas
- Esporulación
- Virulencia

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Zona de Intag

Intag es una zona rural del cantón Cotacachi, posee una superficie de 1725.7 km². La zona se extiende desde las estribaciones occidentales de la Cordillera del Toisán, hasta el límite con las provincias de Esmeraldas y Pichincha (Torres, y otros, 2007, págs. 6-7).

1.2 Características geográficas, morfológicas y ambientales de Intag

Las características topográficas y climáticas del cantón permiten identificar dos zonas diferenciadas: La andina y la subtropical. La primera ubicada en las faldas orientales del volcán Cotacachi, está conformada por las parroquias urbanas: San Francisco, El Sagrario y las parroquias rurales de Imantag y Quiroga. La segunda, la zona subtropical se extiende desde la Cordillera del Toisán hasta el límite con las provincias de Esmeraldas y Pichincha, colindando con la Reserva del Gran Chocó, a este sector pertenecen las parroquias de: Apuela, García Moreno, Peñaherrera, Cuellaje, Vacas Galindo y Plaza Gutiérrez.

La zona de Intag posee una gran cuenca hidrográfica, en donde las numerosas fuentes de agua descienden desde los páramos (a la altura de 4900 m.s.n.m), proyectándose hacia las zonas bajas de los valles. Además cuenta con algunas reservas de bosques primarios catalogados dentro de los 25 puntos biológicos más importantes del planeta (Cazares, 2010, págs. 51-54).

1.3 Asociación de caficultores “Río Intag” - Apuela

AACRI (Asociación Agroartesanal de Caficultores Río Intag), es una organización de segundo grado creada con Registro Oficial N° 980150 del MICIP de 1998, actualmente MIPRO (Ministerio de Industrias y Productividad), hoy adscrita a la Súper Intendencia de Economía Popular y Solidaria, conformada por 123 productores de café. El área

de influencia de la organización, va desde los 600 msnm a los 2100 m.s.n.m., abarca entre 3000 hectáreas aptas para el cultivo de café, ubicadas alrededor de la cuenca del Río Intag, perteneciente a los cantones de Cotacachi y Otavalo, provincia de Imbabura. La asociación trabaja en el desarrollo equitativo y ambientalmente sostenible, con el propósito de mejorar la calidad de vida de los asociados, mediante la producción, procesamiento artesanal y comercialización directa del café orgánico de altura, el mismo que es cultivado bajo sistemas agroforestales (Fuentes, 2013, pág. 1).

1.4 Café

Según Alulima, los cafetos son arbustos perennifolios que llegan hasta los 12 m de altura. En las áreas agrícolas son podados entre los 2 y 4 m de altura, para una mejor recolección. Las hojas son elípticas, algo onduladas y opuestas. Florece a partir del tercer año de crecimiento, produciendo inflorescencias axilares, de color blanco o rosáceo; dependiendo de la especie. El fruto es una drupa, que se desarrolla en unas 15 semanas a partir de la floración. El mesocarpio forma una pulpa dulce y aromática, de color rojizo, botánicamente es una cereza que madura en unas 28 semanas desde la floración (2012, págs. 15-16).

1.4.1 Clasificación taxonómica

“Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Sub-División: Angiospermae
Clase: Magnoliata
Sub-clase: Asteridae
Orden: Rubiales
Familia: Rubiaceae
Género: *Coffea*
Especie (s): *arabica, canephora, liberica, etc.*”

Fuente: (Tequendamia, 2014, pág. 2)

1.5 Cafés especiales en el Ecuador

En el mercado del café, el sector que en la actualidad muestra índices de progreso continuo es el de los “Speciality Coffees”, en este grupo se encuentra el café gourmet, café bajo sombra, el café de comercio justo y el café orgánico. La creciente demanda por este tipo de cafés se explica por la tendencia actual de los consumidores hacia estilos de vida más sanos, alimentos saludables, de mayor calidad y compatibles con el medio ambiente.

Hoy en día, se ha incrementado el cultivo de cafés especiales en las zonas del sistema montañoso Chongón-Colonche, también en las estribaciones occidentales y orientales de la Cordillera de los Andes, destacándose las zonas de Intag, en Imbabura; Tandapi, en Pichincha; Moraspungo, en Cotopaxi (Coronel, 2010, pág. 4).

1.5.1 Café orgánico

En base a los estándares de producción y procesamiento, internacionalmente reconocidos, el café orgánico se orienta a proteger la salud humana y promover los sistemas sostenibles de producción. En su producción se prescinde del empleo de agroquímicos, por lo tanto se puede utilizar biofertilizantes, repelentes naturales, coberturas vegetales entre otras prácticas ecológicas. En Ecuador, existen alrededor de mil fincas cafetaleras orgánicas certificadas en las provincias de Manabí, Loja, El Oro, Imbabura, Zamora Chinchipe y Morona Santiago (Coronel, 2010, págs. 4-6).

1.5.2 Normativa general para promover y regular la producción orgánica-ecológica-biológica en el Ecuador

La normativa DAJ-20133EC-201.0099 del 30 de septiembre del 2013 cuenta con varios capítulos descritos en la Tabla 1.

Tabla 1.

Descripción capitular de la normativa general para promover y regular la producción orgánica-ecológica-biológica en el Ecuador

CAPÍTULO I	• Objetivos y ámbito de aplicación
CAPÍTULO II	• De la autoridad nacional competente
CAPÍTULO III	• Del plan nacional de fomento de la producción orgánica
CAPÍTULO IV	• Del sistema nacional de control de la producción orgánica • Resolución n°99

Nota: (BSC, 2014)

Según lo revisado de la normativa general para promover y regular la producción orgánica-ecológica-biológica en el Ecuador; del capítulo IV, Resolución N° 99 se extrae lo siguiente:

De los principios de la producción orgánica

Se basará en los siguientes principios:

a) El diseño y la gestión adecuada de los procesos biológicos basados en sistemas ecológicos que utilicen recursos naturales propios del sistema mediante métodos que:

- Utilicen organismos vivos y métodos de producción mecánicos.
- Excluyan el uso de OGM (Organismos Genéticamente Modificados), o sus derivados, salvo el caso de medicamentos veterinarios (art. 5, 2014).

Del manejo de plagas

El manejo de malezas, plagas y enfermedades debe ser realizado considerando siempre la prevención de cultivos antes que el control y aplicar cualquiera de las siguientes medidas o la combinación de éstas:

- Se planificará el espacio territorial dejando áreas de refugio o de atracción para los controladores biológicos en áreas sin cultivo, ecoislas, cabeceras con especies labiadas o atrayentes, áreas de bordura, cortinas rompevientos, etc. (art. 20, 2014).
- “Enemigos naturales, incluida la liberación de depredadores y parásitos” (BSC, 2014, pág. 35).

1.5.2.1 Norma para producción orgánica de café arábigo

Las normas internas para la producción de café arábigo orgánico, fueron actualizadas por líderes y lideresas de las organizaciones de caficultores orgánicos de varias provincias del país. El documento se fijó con los siguientes puntos:

- Plan de mejoramiento de la Finca
- Renovación de cafetales
- Rehabilitación de plantaciones de café
- Diversificación de los Sistemas de Producción
- Conservación de los Recursos Naturales y Biodiversidad
- Asociación temporal y permanente de cultivos con el cafetal
- Reciclaje de la materia orgánica y elaboración de abonos orgánicos
- Nutrición de plantas y fertilización orgánica
- Manejo integrado de los problemas fitosanitarios
 - Favorecer la acción de los enemigos naturales de las plagas y patógenos de los cafetos, mediante aplicaciones mensuales de biol y/o caldo microbiano, eliminar de raíz los cafetos enfermos, regular la sombra, aplicar abonos orgánicos, sólidos y líquidos, en los cafetales
- Manejo ecológico de malezas en cafetales
- Podas de los cafetos
- Mejora de la postcosecha y calidad del café
- Comercialización asociativa del café
 - Contribuir al fortalecimiento de la organización de productores
 - Participar activamente en la gestión de la comercialización asociativa de cafés especiales (Cofenac, 2013, págs. 1-35).

1.6 Plagas y enfermedades del café

Las plagas y enfermedades que atacan al cafeto provocan grandes pérdidas en la producción. Por este motivo reconocerlas a tiempo favorece sobremanera a mejorar el rendimiento de los cultivos de café. Las principales enfermedades de los cafetales son causadas por hongos, bacterias, virus y nemátodos, la de mayor importancia es la roya, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*; mientras que la plaga que mayor efecto negativo provoca es la broca del café *Hypothenemus hampei* (Vazquez, 2011, pág. 44).

Tabla 2.

Principales plagas y enfermedades del café

Plagas y enfermedades	Agentes promotores
Sancocho (“Damping off”)	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp.
Cancros	<i>Myrothecium roridum</i>
Mancha Cercospórica	<i>Cercospora coffeicola</i>
Roya	<i>Hemileia vastatrix</i>
Moho de Hilachas	<i>Pellicularia koleroga</i>
Mal Rosado	<i>Corticium salmonicolor</i>
Gotera	<i>Mycena citrocolor</i>
Antracnosis	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Llaga Macana	<i>Ceratocystis fimbriata</i>
Marchitez Vascular	<i>Fusarium oxysporum</i>
Pudrición de la Raíz	<i>Rosellinia bunodes</i>
Fumagina	<i>Capnodium</i> spp.
Nematodos	<i>Meloidogyne</i> sp., <i>Pratylenchus coffea</i>
Minador de la hojas del Café	<i>Leucoptera coffeella</i>
Barrenador de las Ramas	<i>Xilosandrus morigerus</i>
Hormiguilla	<i>Mirmelachysta ramulorum</i>
Queseras	<i>Coccus viridis</i>
Broca del Café	<i>Hypothenemus hampei</i>

Nota: (Alvarado & Monroig, 2007)

1.6.1 La Broca

La broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae), es la plaga del cultivo del café que mayor pérdida en la producción ocasiona por lo tanto, es la que mayor importancia económica representa a las zonas cafeteras del mundo (Ospina, 2002, pág. 18).

1.6.1.1 Morfología

La broca del café viene a ser un insecto negruzco similar a un gorgojo de entre 1 a 2 mm de longitud. La hembra se caracteriza por ser más grande que el macho, con un margen frontal del pronoto con cuatro dientes, setas erectas más largas que anchas, sobre élitros lisos, brillantes, y con una sutura mediana frontal de la cabeza larga (Aristizábal, Salazar , & Mejía , 2002, págs. 18-19).

Estados de desarrollo de *Hypothenemus hampei*.

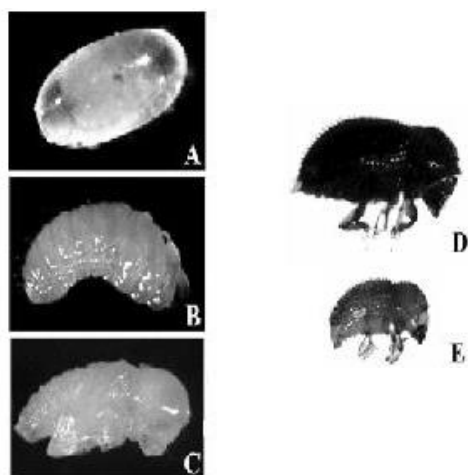


Figura 1. A. huevo. B. larva. C. pupa. D. hembra. E. macho.

Fuente: (Constantino, et al., 2011)

1.6.1.2 Ciclo de vida y reproducción

El ciclo de vida de este coleóptero inicia desde que coloniza el fruto hasta cuando se desarrolla su progenie, el mismo que pasa por los estadios de huevo, larva, pre-pupa y pupa adulta, su crecimiento puede durar de 25 a 45 días, dependiendo de condiciones como la altitud, humedad, temperatura y estado del fruto (Monzón, 2004, pág. 6).

Después de la floración del café entre la semana 8 a la 16, cuando alrededor del 20% del peso seco del fruto es endospermo sólido, la hembra adulta previamente fertilizada por el macho, vuela en busca de frutos aptos para ovipositar. Deposita entre 35 a 46 huevos de color blanco (Echeverría, 2006, pág. 11).

La población de hembras es 10 veces mayor a la de los machos. Debido a esta situación, las poblaciones pueden llegar a ser sumamente numerosas, más cuando los machos no pueden desplazarse por no tener alas (Aristizábal, Salazar , & Mejía , 2002, págs. 18-19).

1.6.2 *Fusarium oxysporum*

A *Fusarium oxysporum*, se lo considera un hongo de suelo ya que se lo encuentra asociado con las raíces de plantas bien sea como parásito o saprófito. *Fusarium* spp. es un patógeno agresivo colonizador de tejidos moribundos, puede fácilmente reemplazar a otro organismo patógeno. *Fusarium oxysporum*, generalmente actúa como hongo sistémico que contagia al sistema radicular y asciende a través de los haces vasculares de la parte aérea (Lara, 2010, pág. 5).

1.6.2.1 Morfología

Al inicio presenta un micelio incoloro, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones adquieren una coloración rosa pálido o algo púrpura.

Este hongo produce conidióforos alargados en forma de botella, verticilados, septados, individuales o agrupados en esporodoquios, también presenta conidias hialinas y variables, produce tres tipos de esporas asexuales.

- **Microconidias:** son conidias pequeñas, de forma esférica, ovalada; producidas en cabezuelas o en cadena.
- **Macroconidias:** son estructuras largas en forma de media luna o elípticas, multiseptadas generalmente de 2 a 9 septas, están ubicadas en los esporodoquios. Los ápices son puntiagudos, romboides o en forma de gotero.
- **Clamidosporas:** poseen pared gruesa y redonda. Se forman terminalmente o intercaladas en el micelio más viejo. Las clamidosporas pueden permanecer largo tiempo en el suelo debido a que están adaptadas a condiciones adversas (Lara, 2010, pág. 6).

1.6.2.2 Ciclo de vida y reproducción

La reproducción de *Fusarium oxysporum*, es a través de la formación de microconidias y macroconidias. Las hifas presentan células uninucleadas, aunque bajo ciertas condiciones, las células de las hifas jóvenes pueden ser multinucleadas. Las unidades reproductoras o conidias especializadas cumplen diversas funciones como: multiplicación del hongo, diseminación, resistencia a condiciones adversas y variabilidad genética (Lara, 2010, pág. 6).

Ciclo Biológico de *Fusarium* spp.

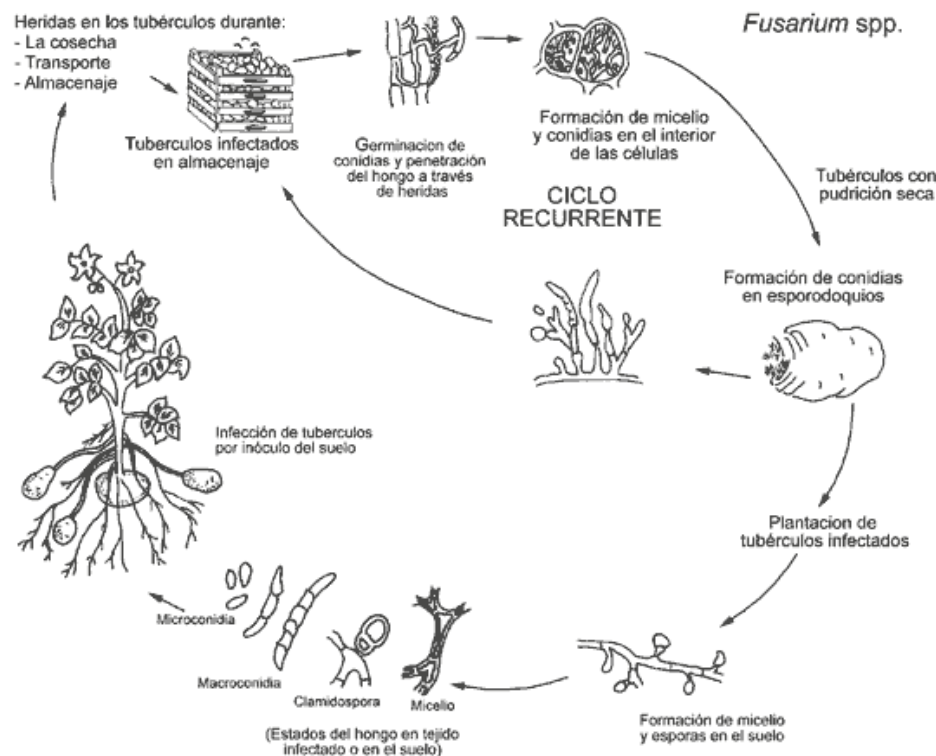


Figura 2. Representación gráfica del ciclo biológico y el desarrollo del mecanismo de infección de *Fusarium* spp. en papa.

Fuente: (Villafuerte, 2008)

1.7 Control biológico

Nicholls menciona que, la definición más apropiada y de mayor aceptación es la que dio DeBach (1964): “La acción de los parasitoides, depredadores o patógenos para mantener la densidad de la población de un organismo plaga a un promedio más bajo del que ocurriría en su ausencia”. (2008, pág. 1). Es decir el uso de organismos benéficos (enemigos naturales) contra aquellos que causan daño (plagas).

1.7.1 Estrategias de control biológico

“Los agentes de control biológico se usan de diferentes maneras para el control de las plagas agrícolas. Básicamente se distinguen tres formas de control biológico: por introducción (clásico), aumento y conservación” (Nicholls, 2008, pág. 169).

- **Control biológico clásico**

Este tipo de control consiste en la regulación de la población de una plaga mediante el uso de enemigos naturales exóticos (parásitos, depredadores o patógenos), ya que cuando un insecto que ataca cultivos se introduce de un país a otro, en la nueva región éste suele convertirse en plaga de los cultivos (plaga exótica), porque en el nuevo sitio no tiene sus enemigos naturales que regulen sus poblaciones. Para la regulación de plagas exóticas los especialistas del control biológico desarrollaron la técnica denominada introducción de enemigos naturales o “Control Biológico Clásico”

- **Control biológico aumentativo**

En este tipo de control se usa al momento en que las poblaciones de enemigos naturales no están presentes o no responden con suficiente rapidez al aumento de la población de plagas. Esta estrategia requiere la propagación masiva y la liberación periódica de enemigos naturales exóticos o nativos, los cuales se multiplican durante la estación de crecimiento del cultivo. Esto se consigue mediante la producción masiva, la colonización periódica o el mejoramiento genético de los enemigos naturales

- **Control biológico conservador (conservación y manejo del hábitat)**

Este Control enfatiza el manejo de agroecosistemas, con el fin de proveer un ambiente general conveniente a la conservación y desarrollo de una biota compleja de enemigos naturales. Esto implica

identificar los factores que limitan la efectividad de un enemigo natural particular y modificarlos para incrementar la efectividad de las especies benéficas. (Nicholls, 2008, pág. 170).

1.7.2 Importancia del control biológico

La razón más llamativa para la incorporación del Control Biológico en el manejo de un cultivo es la reducción del uso de equipo especializado, mano de obra y plaguicidas. Estos últimos por su toxicidad elevada, persistencia en el medio, resistencia de plagas. Lo que ha generado una preocupación por la calidad del ambiente, conduciendo a poner más énfasis en estrategias alternativas de control de plagas.

Al Control Biológico se lo considera como el método de control de plagas más viable, ecológicamente recomendable y auto sostenido. Pero, en la mayoría de los casos el Control Biológico por sí mismo, no provee una supresión económicamente aceptable de una plaga en los sistema agrícolas; es por esto que debe ser desarrollado e implementado como un componente del Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Guédez, Castillo, Cañizales, & Olivar, 2009, págs. 58-59).

1.7.3 Hongos entomopatógenos

“Un hongo entomopatógeno es un agente biótico, microscópico que origina enfermedad en insectos y arácnidos” (Cabello, 2007, pág. 2). Estos hongos logran un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol. Sobreviven en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición. El crecimiento saprófito puede dar como resultado la producción de conidióforos, conidias y desarrollo miceliano.

Constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos. Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos. Entre los más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*,

Eryniopsis, *Akanthomyces*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Monzón, 2001, págs. 97-100).

1.7.3.1 *Beauveria bassiana*

Este hongo fue descrito por primera vez por Jean Beauverie en 1911 con el nombre de *Botrytis bassiana*. posteriormente, Vuillemin la catalogó en su clase actual. Ensayos enzimáticos posteriores, determinaron el género como *Beauveria* spp., y diferenciaron seis especies: *B. alba*, *B. amorpha*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata* y *B. caledonica* (Kouassi, 2001, págs. 2-3).

“*Beauveria bassiana* es un hongo saprófito facultativo que tiene células quitinizadas y parasita insectos, gracias a sus mecanismos físicos y químicos de infección”. (Echeverría, 2006, pág. 13). “Este hongo causa una fatal enfermedad en los insectos llamada muscardina blanca que visualmente da el aspecto de momificación al insecto atacado” (Lecuona, 2007, pág. 15).

1.7.3.2 Taxonomía

Reino: Fungi
División: Amastigomicotina
Sub-división: Deuteromycotina
Clase: Hyphomycete
Orden: Moniliales
Familia: Moniliaceae
Género: *Beauveria*
Especie: *bassiana* (Balsamo) Vuillemin

Fuente: (Kouassi, 2001, pág. 3)

1.7.3.3 Morfología

- Características macroscópicas

“Crece como un algodón blando al principio y luego toma un aspecto amarillento o rosa pálido, con el paso de los días se vuelve de aspecto polvoriento y de color crema producto de la esporas. El reverso es blanco o amarillo pálido” (Ortiz, 2009, pág. 15).

- Características microscópicas

“*Beauveria bassiana*, es un hongo imperfecto, posee hifas septadas que contienen las estructuras reproductivas denominadas conidióforos, sobre los cuales se desarrollan las conidias” (Hernández & Berlanga, 1999, pág. 1).

Las conidias son células únicas haploides e hidrofóbicas, globosas y ovales de color blanco cremoso posee esterigmas alternados en zigzag alargados en su extremo distal llamados raquis. En cultivos sólidos el hongo produce conidias de forma esférica (1-3 μms de diámetro) u oval (1.5 - 5.5. x 1 - 3 μms). Las blastosporas no son tan infecciosas como las conidias (Ortiz, 2009, pág. 16).

Estructura microscópica de *Beauveria bassiana*

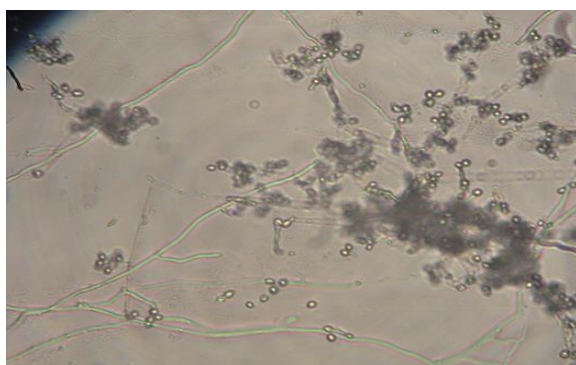


Figura 3. Visualización de la morfología de *Beauveria bassiana* de una cepa del Laboratorio AACRI

Fuente: (Carcelén, 2013)

1.7.3.4 Condiciones de crecimiento

Tabla 3.

Condiciones de crecimiento de *Beauveria bassiana*

Factor	Descripción
pH	Crecimiento entre 5,7 – 5,9
Temperatura	Crecimiento entre 25 – 30°C (mínimo de 10°C y máximo de 30°C)
Humedad	Alrededor del 94%
Necesidades Nutricionales	Sacarosa, fuentes de carbono (glucosa, almidón, pectina) y nitrógeno (peptona)..

Nota: (Matínez , 2010)

1.7.3.5 Mecanismo de acción

El desarrollo de *Beauveria bassiana* sobre insectos se divide en las siguientes etapas:

- Adhesión de la conidia a la epicutícula del insecto: Consiste en la fijación de los propágulos del hongo con la superficie del insecto.
- Germinación de la unidad infectiva sobre la cutícula: Proceso mediante el cual una conidia emite uno o varios tubos germinales que por crecimiento y alargamiento dan origen a las hifas.
- Penetración en la cutícula del insecto por el tubo germinativo: La penetración de la hifa a través del integumento envuelve factores mecánicos y enzimáticos, se desarrolla el apresorio (estructura celular que ejerce presión contra las capas cerosas del exoesqueleto), al mismo tiempo se liberan varios tipos de enzimas como quitinasas y cutinasas. (Arias, Banda, Bejarano, Benites, & Arellano, 2014, pág. 6).

- Producción de metabolitos tóxicos: El integumento de los insectos está compuesto por proteínas y quitina asociados con lípidos y compuestos fenólicos, la capa más externa o epicutícula contiene lípidos (ácidos grasos y parafinas). El complejo enzimático (lipasas, quitinasas y enzimas proteolíticas) de este hongo entomopatógeno es capaz de atacar el complejo proteína-quitina del insecto. El hongo posteriormente al cruce de la barrera del integumento, por histólisis, se desarrolla en el hemocele en presencia de las reacciones defensivas celulares.

Beauveria bassiana produce toxinas las cuales erosionan el granuloma y permiten a las blastosporas invadir el hemocele, los cuerpos hifales proliferan solamente después de la muerte del huésped, así el papel de las toxinas entomógenas es de particular importancia en el proceso de infección. (Hernández & Berlanga, 1999, pág. 2). Las toxinas como beauvericina, beauverolidos, bassianolides, isarolides, ácido oxálico, destruxinas y tochalasinas causan la muerte del insecto debido a la degeneración de los tejidos, producto de la pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido (Arias, Banda, Bejarano, Benites, & Arellano, 2014, pág. 6).

- Muerte del huésped: Cuando el insecto huésped fallece, *Beauveria bassiana* continua creciendo saprofiticamente y se dispersa a través de todos los tejidos del insecto en competencia con la flora bacterial intestinal produciendo oosporein, un pigmento antibiótico rojo que le da una coloración característica al cadáver, aplacando el crecimiento de bacterias.
- Producción de unidades infectivas en el exterior del insecto: Después de la completa invasión del cadáver de insecto, el desarrollo posterior del hongo sobre el insecto momificado depende de la humedad relativa ambiental. En la broca del café bajo condiciones de laboratorio, el micelio de *Beauveria bassiana* emerge y esporula sobre cualquier parte del insecto, quedando frecuentemente los élitros y cabeza libres de micelio (Hernández & Berlanga, 1999, pág. 2).

1.7.3.6 Principales insectos blanco de *Beauveria bassiana*

En la agricultura, este hongo es ampliamente utilizado para el combate del escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), broca del café (*Hypothenemus hampei*), termitas y hormigas (*Acromyrmex* sp, *Atta* sp), broca del maíz (*Ostrinia nubilalis*), oruga del pino (*Dendrolimus* spp), grillos verdes (*Nephotettix* spp) y la polilla (*Laspeyresia pomonella*), entre otros.

En el ambito de salud humana, cepas de *Beauveria bassiana* arremeten contra la mosca tse-tse (*Glossina morsitans*), mosquito de la arena (*Phlebotomus* sp) que transmite Leishmania, insectos del género *Triatoma* y *Rhodnius*, vectores de la enfermedad del Chagas, y *Anopheles stephensi*, transmisor de la malaria (Echeverría, 2006, pág. 15).

1.7.3.7 Bioensayos con *Beauveria bassiana*

La producción de estos hongos se debe iniciar con un organismo cuya viabilidad y eficacia asegure la calidad del producto final, para ello se requiere que estos se pasen o reactiven sobre el insecto al cual van dirigidos y conservar sus propiedades patogénicas y su virulencia (Bustillo & Marín, 2002, pág. 1).

1.7.4 Hongos antagonistas

Son agentes biológicos con potencial para interferir en cualquiera de los procesos vitales de los patógenos vegetales. (Jacas, Caballero, & Avilla, 2005, págs. 19-21).

1.7.4.1 *Trichoderma harzianum*

El género *Trichoderma* spp. está presente en el ambiente y en mayor porcentaje en el suelo. Se localiza en suelos abundantes en materia orgánica y por su relación con ella está clasificado en el grupo de hongos hipogeos, lignícolas y depredadores. Es aeróbico y pueden estar en los suelos con pH neutro hasta ácido. *Trichoderma harzianum* se caracteriza por la alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Villegas, 2012, págs. 1-2).

1.7.4.2 Clasificación taxonómica

Reino:	Fungi
División:	Mycota
Sub-división:	Eumycota
Clase:	Hyphomycetes
Orden:	Moniliales
Familia:	Moniliaceae
Género:	<i>Trichoderma</i>
Especie:	<i>harzianum</i> , etc.

Fuente: (Cholango, 2009, pág. 13)

Tabla 4.

Principales especies de *Trichoderma*

<i>Trichoderma austrokoningii</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma koningii</i>	<i>Trichoderma koningiopsis</i>
<i>Trichoderma piluliferum</i>	<i>Trichoderma phyllostahydis</i>	<i>Trichoderma petersenii</i>	<i>Trichoderma ovalisporum</i>	<i>Trichoderma oblongisporum</i>
<i>Trichoderma pubescens</i>	<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	<i>Trichoderma polysporum</i>	<i>Trichoderma pleurotum</i>	<i>Trichoderma pleurotica</i>
<i>Trichoderma sinensis</i>	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	<i>Trichoderma rossicum</i>	<i>Trichoderma rogersonii</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
<i>Trichoderma stromaticum</i>	<i>Trichoderma strigosum</i>	<i>Trichoderma stramineum</i>	<i>Trichoderma spirale</i>	<i>Trichoderma sinuosum</i>
<i>Trichoderma virens</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma viridescens</i>	<i>Trichoderma taiwanense</i>	<i>Trichoderma surrotundum</i>
<i>Trichoderma thailandicum</i>	<i>Trichoderma thelephoricolum</i>	<i>Trichoderma theobromicola</i>	<i>Trichoderma tomentosum</i>	<i>Trichoderma velutinum</i>

Fuente: (E-Centro, 2012)

1.7.4.3 Morfología

- Características macroscópicas

Las colonias de *Trichoderma harzianum*, en su inicio se ven como una superficie lisa, pero la formación de esporas aéreas, permite observarlas ligeramente algodonosas (color blanco). El color de las colonias se torna gradualmente a verde claro o amarillento por la formación de fialosporas que finalmente se tornan de color verde oscuro opaco. El micelio es ralo en su mayoría (Cruz, 2007, pág. 28).

- Características microscópicas

El micelio posee hifas hialinas, septadas y ramificadas al igual que los conidióforos. Estos terminan en fiálides donde se forman los conidios. Los conidios tienen de 2 a 3 μm de diámetro en promedio, de forma ovoide, lisos y se observan hialinos o de color verde brillante al microscopio (Cruz, 2007, págs. 28-29), se caracterizan por poseer una gruesa pared exterior. “Esta pared se diferencia de la pared celular de las células vegetativas del hongo (hifas y clamidosporas), que son mucho más delgadas y no están formadas por capas constitutivas como los conidios” (Hoyos, Duque, & Orduz, 2008, pág. 78).

Estructura microscópica *Trichoderma harzianum*.



Figura 4. Visualización de la morfología de *Trichoderma harzianum* de una cepa del Laboratorio AACRI

Fuente: (Carcelén, 2013)

1.7.4.4 Condiciones de crecimiento

Tabla 5.

Condiciones de crecimiento de *Trichoderma harzianum*

Factor	Descripción
Fototropía	Períodos alternados de luz y oscuridad, favorece la colonización de sustratos.
pH	Crecimiento entre 2 y 9 (pH óptimo entre 4,0 y 7,0)
Temperatura	Crecimiento entre 10 °C a 40 °C (temperatura óptima 25 °C)
Humedad	Alrededor del 70 y 80%
Necesidades Nutricionales	Principalmente necesita una fuente de carbono (almidón, pectina, celulosa), fuente de nitrógeno (urea, sulfato de amonio). Los elementos traza requeridos para el crecimiento de hongos en general incluyen hierro, zinc, cobre, entre otros.

Nota: (Noboa & Quelal, 2014)

1.7.4.5 Mecanismos de acción

En la acción biocontroladora de *Trichoderma* se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos dianas.

- Micoparasitismo

En este mecanismo están implicadas varias enzimas. El desarrollo de cada etapa depende de los hongos involucrados, de la acción biotrófica o necrotrófica del antagonista y de las condiciones ambientales.

- Crecimiento quimiotrófico: es la localización del hospedante. *Trichoderma* puede detectarlo a distancia y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico.
- Reconocimiento: se realiza a través de interacciones lectina-carbohidrato. Las lectinas están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular.
- Adhesión y enrollamiento: Las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante apresorios, que se enrollan alrededor de estas. La adherencia de las hifas se da por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina de la pared del patógeno.
- Actividad lítica: *Trichoderma* excreta varias enzimas (celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas), que participan en la lisis de la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y de hifas que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatógeno.

El micoparasitismo termina con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del hospedante, lo que disminuye la actividad patogénica del mismo (Infante, Martínez, González, & Reyes, 2008, págs. 16-17).

- Antibiosis

La actividad antibiótica de algunos aislamientos se debe también a la producción de compuestos volátiles. Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un “hiperparasitismo” de origen enzimático (Hoyos, Duque, & Orduz, 2008, pág. 86).

- Estimulación de defensas en la planta

Trichoderma spp., induce defensas para producir fitoalexinas, a las cuales son sensibles algunos hongos patógenos. Las fitoalexinas como el orquinol, la trifolirizina o la isocumarina, son formadas cuando se produce la invasión de las

raíces u otros órganos por hongos, las que hipotéticamente actúan en forma comparable a los anticuerpos animales. En el caso de *T. harzianum*, éste induce altos niveles de fitoalexinas de tal forma que el nivel tóxico alcanzado evita que otros hongos patógenos se puedan establecer (Quinchiguango, 2008, págs. 27-30).

1.7.4.6 Principales fitopatógenos blanco de *Trichoderma harzianum*

Diferentes especies de *Trichoderma* tienen la capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium* f. *dianthii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotricum gloesporioides*, *Sclerotium rolfsii*, *Rosellinia bunodes*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora Cactorum* y *Botrytis cinerea* (Villegas, 2012, págs. 1-2).

1.7.4.7 Pruebas de antagonismo

Las pruebas de antagonismo permiten realizar la selección preliminar de aislamientos facilitando el trabajo, ya que no es probable que un antagonista eficiente en el campo no lo sea en el laboratorio.

Tabla 6.

Escala para la medición del antagonismo (Escala de Bell)

Clase 1	<i>Trichoderma</i> spp. crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.
Clase 2	<i>Trichoderma</i> spp. crece al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
Clase 3	<i>Trichoderma</i> spp. y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
Clase 4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp.
Clase 5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> spp. ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

Nota: (CET, 2004)

1.8 Producción de hongos antagonistas y entomopatógenos

La producción se fundamenta en la propagación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (esporas y/o conidias) en un sustrato natural. Los métodos de producción desarrollados incluyen desde la multiplicación artesanal realizada por los mismos productores, la producción semi-industrial a mediana escala, hasta la producción industrial a gran escala, para la cual se requiere de reactivos y equipos más especializados. (Granda, 2006, pág. 12)

1.8.1 Producción semi-industrial

“El proceso de producción semi-industrial consta de varias fases, que van desde la obtención del cultivo puro hasta la formulación del producto. En general el proceso está organizado en dos etapas, la etapa de cepario y la etapa de producción” (Granda, 2006, pág. 13).

1.8.1.1 Etapa de cepario

“Comprende el aislamiento de la cepa y la obtención del cultivo puro. Además se considera la obtención de cepas nuevas, el mantenimiento, reactivación y preservación de las cepas” (Granda, 2006, pág. 14).

- Aislamiento

“Es la obtención del hongo a partir de la fuente de inóculo, la cual puede ser desde insectos, plantas, medios artificiales (medios de cultivo de laboratorios), o de preservaciones de la cepa” (Monzón, 2001, pág. 97).

- Cultivos Puros

Un cultivo puro, es el desarrollo únicamente del hongo de interés (sin contaminantes). Al obtener un cultivo puro para incorporarlo al proceso de producción, se debe asegurar que el aislamiento es reciente y que tiene todas las características de la cepa (relacionadas

principalmente a su vigor de crecimiento y a su patogenicidad). Para mantener estas características es necesario reactivar el hongo por lo menos 2 veces al año (Monzón, 2001, pág. 98).

1.8.1.2 Etapa de producción

“La etapa de producción contempla la preparación de los sustratos, inoculación e incubación de bolsas, el proceso de secado, la cosecha del hongo y la preparación de las formulaciones” (Granda, 2006, pág. 18).

- Características de los sustratos

Un sustrato idóneo debe presentar características como: una consistencia suave, suelta, sin aglomeración, que permita un crecimiento homogéneo del hongo. Dentro de los materiales orgánicos que más se utilizan como sustrato consta el arroz, azúcar, melaza, levadura, harina de maíz y caña de azúcar picada. Los sustratos se deben pesar, humedecer (agua destilada), regular el pH y esterilizar (Grabowski, Orrego, & Stauffer, 2005, pág. 27).

Tabla 7.

Características nutricionales de los sustratos en estudio

Sustratos	Características
Arroz	El 94 % del arroz está compuesto fundamentalmente de almidón. Contiene un 77,4 % de hidratos de carbono, un 7,5 % de proteínas y un 1,9 % de lípidos.
Arrocillo	Arrocillo o arroz quebrado es un subproducto que se obtiene durante el proceso de la elaboración del arroz blanco, posee carbohidratos 80%, proteínas 6,7% y fibra 0,1 %
Bagazo de caña de azúcar	La porción fibrosa de la caña después de la extracción del jugo se la conoce como bagazo. Posee una humedad del 49%, un pH de 6.1, fibra 48% (celulosa, pentosana y lignina), carbono 29.36% (azúcares celulósicos sobre todo sacarosa) y Nitrógeno 1,23% (proteínas).
Cascarilla de café	La cáscara del café es prácticamente pura lignocelulosa, no posee valor energético para el desarrollo de hongos pero favorece en la oxigenación de los sustratos.

Nota: (Noboa & Quelal, 2014)

Para una eficiente esporulación y viabilidad de las esporas producidas en sustratos orgánicos es adecuado contar con sustratos que posean alto porcentaje de humedad, bajo contenido de minerales, proteína y grasa (2-3%), y un porcentaje intermedio de fibra 36% (Aceves, 2008, pág. 187).

- Inoculación e incubación de las bolsas

“Las bolsas o fundas son inoculadas con una suspensión de esporas obtenidas a partir de la matriz (inóculo madre)”. Granda sugiere depositar el sustrato en bolsas plásticas de polipropileno y sellarse debidamente para ser esterilizadas. Cada bolsa es inoculada con la suspensión, utilizando una jeringa la cual debe ser estéril. (2006, pág. 20)

Las bolsas inoculadas se ubican en los cuartos de crecimiento o incubadoras donde pasan un período de 6 a 7 días antes de ser extraídas. Durante este período se revisan las bolsas periódicamente, para ir seleccionando las fundas de buena calidad (Granda, 2006, pág. 21).

- Secado y cosecha del hongo

El objetivo del secado es la eliminación de la humedad del hongo. El sustrato contenido en las bolsas es depositado en bandejas, las cuales se colocan en un área a temperatura ambiente para secarlas. El tiempo de secado puede ser menor, si el cuarto de secado se coloca un extractor de humedad. (Granda, 2006, pág. 22)

Posteriormente a la etapa de secado el hongo es recolectado en envases adecuados para su comercialización o puede pasar a una fase posterior de formulación. (Granda, 2006, pág. 22).

- Elaboración de formulaciones

Según Monzón la formulación de hongos, viene a ser el proceso mediante el cual el ingrediente activo (conidias del hongo), se mezcla con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos, con el fin de mejorar la eficacia del hongo (2001, pág. 100).

Los materiales agregados en la formulación tienen como fin favorecer la longevidad del hongo, protegerlo del medio ambiente, aumentar su vida útil y ayudar a su desarrollo una vez aplicado en el suelo.

Tabla 8.

Tipos y descripción de las principales formulaciones de hongos

Tipo de Formulación	Descripción
Suspensión Concentrada	Líquido con el ingrediente activo en suspensión, para aplicar diluido en agua.
Concentrado emulsionable	Líquido homogéneo para ser aplicado como emulsión, luego de ser diluido en agua.
Polvo soluble	Polvo para aplicación luego de dilución de la(s) sustancia(s) activa(s) en agua, en forma de solución verdadera.
Polvo mojable	Polvo para aplicar como suspensión, luego de ser dispersado en agua.
Granulado dispensable	Gránulos para aplicación en forma de suspensión, luego de su desintegración y dispersión en agua
Polvo seco	Formulación sólida, uniforme, en forma de polvo con buena movilidad, únicamente para aplicación directa en forma de espolvoreo.
Granulado	Formulación sólida, uniforme, en forma de gránulos con dimensiones bien definidas, para aplicación directa.
Granulado encapsulado	Gránulos para aplicación directa, que poseen una cobertura para protección o para liberación controlada de la(s) sustancia(s) activa(s).
Macrogranulado	Gránulos con rango de tamaño entre 2000 y 6000 μm
Microgranulado	Gránulos con rango de tamaño entre 100 y 600 μm
Líquido	Producto líquido para aplicar directamente.

Nota: (Urtubia & France, 2007)

1.9 Almacenamiento del producto

Según Granda el producto formulado puede almacenarse en condiciones ambientales por períodos de uno a dos meses, sin que éste pierda su viabilidad, siempre y cuando no esté expuesto directamente a la luz solar o la humedad. El almacenamiento por mayor tiempo, tiene que hacerse en refrigeración a una temperatura aproximada de 4°C (2006, pág. 30).

1.10 Conservación

La finalidad de la conservación es mantener viables las esporas del controlador biológico, eliminando la necesidad de repiques frecuentes, impidiendo la disminución de la virulencia. Existen dos principios de conservación:

- La reducción del metabolismo: Se incluye la conservación mediante bajas temperaturas, uso del aceite mineral, agua estéril, suelo estéril, etc.
- Inducción de la dormancia: Se incluye el secado sobre sílica gel, la liofilización y el uso de nitrógeno líquido (la criogenia, o sea el mantenimiento a temperaturas por debajo del punto de congelación). La liofilización y criogenia requieren de aparatos especiales y de insumos costosos (Cadeño & Ames, 2004, pág. 45).

1.10.1 Conservación en sílica gel

El método de conservación en sílica gel, consiste en extraer la fase líquida de las estructuras; es decir que reduce el metabolismo mediante la desecación. Una vez esterilizada la sílica gel mediante calor seco es importante mantenerla sellada para evitar el contacto con el aire ya que el soporte utilizado es higroscópico. Es un método

seguro y es fácil rehabilitar al microorganismo con todos sus atributos (Cadeño & Ames, 2004, pág. 47).

1.10.2 Conservación en aceite mineral

Este método consiste en recubrir con aceite mineral estéril un cultivo que se encuentre en condiciones óptimas de crecimiento micelial y esporulación, generalmente se utiliza aceite mineral de alta calidad.

Esta práctica disminuye la deshidratación del medio, retarda la actividad metabólica del cultivo para la reducción de la tensión del oxígeno, además de reducir la posibilidad de infestación por ácaros (Alarcón , 2006, págs. 20-25).

1.11 Control de calidad

Control de calidad hace referencia al seguimiento y evaluación de la eficacia en cada uno de los pasos del proceso de producción. Esto se hace con el fin de realizar una selección adecuada del hongo, detectar y descartar la presencia de agentes contaminantes en cada etapa del proceso para obtener al final del mismo un producto de buena calidad (viabilidad, patogenicidad y virulencia) y de buen rendimiento.

Las evaluaciones de rendimiento (conidias por gramo de polvo y viabilidad) se deben realizar al momento de la cosecha y antes de la preparación de la formulación (Granda, 2006, pág. 31). (ver anexo 1)

1.12 Protocolo de laboratorio

Según Stanley un protocolo de laboratorio, también conocido como procedimiento estándar de operaciones, es una lista de instrucciones que se deben seguir para realizar un experimento. Es un plan que se usa para repetir los resultados favorables de un test previo. En un laboratorio de investigación, se necesitan muchos protocolos de seguridad, para operar el equipamiento analítico y para elaborar soluciones con los mínimos errores. (2014, pág. 1)

Cada protocolo debe enfocarse específicamente en un tipo de experimento a ser realizado. Es importante que los resultados y los límites máximos de detección estén definidos, para que el usuario sepa qué esperar al final del experimento.

Los protocolos se desarrollan realizando muchos experimentos diferentes de diversas maneras y resumiéndolos en la mejor práctica. Por lo tanto, cualquier terminología que no esté clara para el lector debe ser explicada. También, todas las publicaciones citadas deben tener referencias para que el lector pueda adquirir más información.

CAPÍTULO 2

MARCO METODOLÓGICO

2.1 Características del área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Asociación Agroartesanal de caficultores “Río Intag” (AACRI), ubicado en Apuela, zona de Intag, cantón Cotacachi, provincia de Imbabura.

Ubicación del Laboratorio AACRI en Apuela, zona de Intag

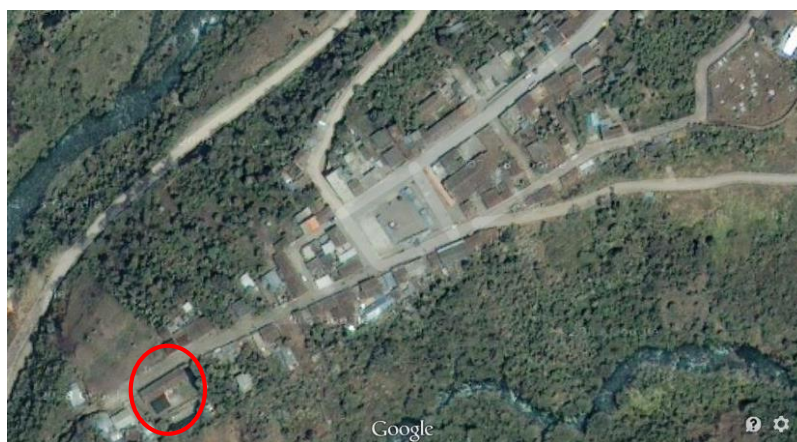


Figura 5. Foto satelital de la ubicación del laboratorio de la AACRI en Apuela
Fuente: (Google Earth, 2015).

2.2 Metodología

El desarrollo de la parte experimental se realizó en dos fases: Fase de campo, donde se recolectaron las muestras de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) y del hongo de la pudrición (*Fusarium oxysporum*), y la fase de laboratorio, donde se realizaron los procesos de reactivación, producción y conservación de las cepas en estudio.

2.2.1 Fase de campo

2.2.1.1 Materiales, equipos y reactivos

a) Material biológico

Aislamiento de (*Fusarium oxysporum*), obtenido a partir de tejido enfermo del tallo y raíz de la planta de babaco, y ejemplares de la broca del café (*Hypothenemus hampei*).

b) Material de laboratorio

- Gavetas plásticas
- Marcadores permanentes

2.2.1.2 Recolección de la Broca del Café (Hypothenemus hampei)

La recolección de *Hypothenemus hampei* se desarrolló en las fincas de dos socios de la AACRI, ubicadas en la parroquia de Apuela.

- Se extrajeron manualmente de las plantas de café 200 frutos infectados con la broca (*Hypothenemus hampei*).
- Se colocaron las cerezas de café en gavetas plásticas debidamente etiquetadas.
- Se trasladaron al Laboratorio de Microbiología de la AACRI (ver anexo 2).

2.2.1.3 Recolección de (Fusarium oxysporum)

Para la obtención de (*Fusarium oxysporum*), se recolectó una planta enferma de babaco con síntomas característicos de este hongo, esto se realizó en la comunidad de Peribuela, perteneciente al cantón Urcuquí, provincia de Imbabura.

- Se extrajeron la raíz y tallo de la planta y se tomaron muestras de las mismas.
- Se envolvieron las muestras en papel cartón y se colocaron las etiquetas respectivas.

- Se trasladaron las muestras al laboratorio de microbiología de la AACRI, para aislar el hongo (ver anexo 3).

2.2.2 Fase de laboratorio

2.2.2.1 Materiales, equipos y reactivos

a) Material biológico

Se emplearon cultivos puros de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, obtenidos previamente de aislamientos propios de la zona de Intag.

b) Material orgánico (sustratos)

- Arroz
- Arrocillo
- Bagazo de caña de azúcar
- Cascarilla de café

c) Material de laboratorio y otros

- Placas porta y cubre objetos
- Tubos de ensayo
- Cajas petri de plástico y vidrio
- Erlenmeyer de 125 y 250 ml
- Vasos de precipitación de 500 y 1000 ml
- Frascos graduados de 500 ml
- Pipetas de 5 y 10 ml
- Pipetas volumétricas de 100 y 1000 µl
- Mecheros
- Pinzas
- Pizetas
- Papel filtro

- Papel absorbente
- Papel tipo cartón
- Algodón
- Guantes estériles
- Cinta adhesiva masking
- Estilete
- Marcadores permanentes
- Macarillas, cofias y zapatones
- Jeringuillas de 10 ml
- Fundas de polietileno
- Calculadora
- Gavetas plásticas
- Bisturí

d) Equipos

- Cámara de Neubauer
- Estufa
- Cámara de flujo laminar
- Balanza de precisión
- Autoclave
- Microscopio
- Estereoscopio
- Incubadoras
- Refrigerador
- Extractor de humedad
- Cámara fotográfica

e) Reactivos

- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Extracto de carne
- Peptona

- NaClO
- Polisorbato 80 (Tween 80)
- Ácido láctico.

2.2.2.2 Etapa de diagnóstico

a) Inspección del laboratorio de microbiología de la AACRI

Se observaron y tomaron fotos del estado de cada área, incluyendo infraestructura, materiales, equipos y cepas.

Se inventarió material, equipos y reactivos. Se etiquetó lo caducado y se adquirió lo necesario para la implementación de la nueva metodología de producción.

b) Observación y descripción del proceso de producción de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* de la AACRI.

Se observaron todas las etapas de producción de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*. La información obtenida se registró mediante fotografías y apuntes del proceso (ver anexo 4).

c) Reactivación de las cepas de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*

La AACRI cuenta con un banco de microorganismos que se mantienen en refrigeración, a partir del mismo se inició el desarrollo del protocolo de producción y conservación de los hongos en estudio.

- De las cepas refrigeradas a 4 °C, se seleccionaron 4 cajas petri y 1 tubo de ensayo de la cepa de *Beauveria bassiana*, más 2 cajas petri y 2 tubos de ensayo de la cepa de *Trichoderma harzianum*, ya que estos presentaron buenas características (sin contaminación y mayor esporulación).
- Las cepas se sometieron a medios de enriquecimiento para reactivar su desarrollo (ver anexo 5).
- De cada medio de enriquecimiento se tomaron 5ml y se colocaron en un tubo de ensayo de 12 ml de volumen. En total se obtuvieron 36 tubos.

- Se tomó una asada de cada muestra (tubo de ensayo o caja petri) de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* y se depositaron dentro de cada tubo.
- Se etiquetaron los tubos con la fecha y el medio de enriquecimiento.
- Se agitaron durante 4 horas.
- Con una pipeta se colocaron 100 µl del contenido de cada tubo en cajas petri y tubos de ensayo con PDA
- Se llevaron a incubación durante 7 días a 27 °C
- Se realizó un conteo de las cepas en cámara de Neubauer (ver anexo 6).

d) Activación de la virulencia de *Beauveria bassiana*

- El inóculo del hongo se preparó en un Erlenmeyer con 100 ml de agua destilada más el 75% de la biomasa contenida en una caja petri y se mantuvo en agitación por 16 horas con un agitador orbital universal.
- Se realizó un conteo de la concentración de esporas del inóculo en ufc/ml de inóculo en cámara de Neubauer.
- Se procedió a la extracción manual de las brocas (insecto blanco), con la ayuda de un bisturí y se colocaron 20 brocas en la caja Petri.
- En cámara de flujo, se desinfectó cada broca en NaCl (hipoclorito de sodio), al 0,5% por inmersión durante 10 minutos.
- Con 500 ml de agua destilada contenidos en una pizeta se lavaron 3 veces las brocas, para eliminar residuos de la solución anterior.
- Se colocaron las brocas sobre papel toalla estéril, eliminando el exceso de agua destilada
- Con la ayuda de un pincel, se tomaron las brocas y se las colocó en cajas petri estériles (15 brocas/caja petri).
- Se agregaron 10 ml del inóculo en cada caja petri y se dejó en reposo por 7 minutos.
- Se colocaron las brocas inoculadas en cámara húmeda y se trasladaron a incubación por 7 días a 27 °C
- Las brocas esporuladas se ubicaron en cajas petri con PDA y se dejaron en incubación bajo las mismas condiciones anteriores (ver anexo 7).

e) Activación de la virulencia de *Trichoderma harzianum*

Para la activación de la virulencia de *Trichoderma harzianum*, se desarrolló la prueba de antagonismo por disco dual. Se aisló el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (ver anexo 8) y se lo confrontó con el hongo antagonista.

- Se esterilizó todo el material necesario en la autoclave a 121 °C por 15 minutos y una atmósfera de presión.
- Se preparó el inóculo de cada microorganismo (de la misma manera que el inóculo de *Beauveria bassiana*). El inóculo fue colocado en tubos de ensayo de 15ml de capacidad.
- Se colocaron 15 discos de papel filtro de 0,5cm de diámetro dentro de cada tubo, se agitaron vigorosamente y se dejaron en reposo por 20 minutos.
- Los discos se extrajeron con ayuda de una pinza y se dejaron secar al aire dentro de una caja petri abierta, dentro de la cámara de flujo.
- Se ubicó un disco de cada hongo equidistantemente en cajas petri con PDA, además se ubicó un testigo por cada hongo (el testigo es la cepa individual).
- Las cajas se sometieron a incubación a 27°C por 7 días (ver anexo 9).

2.2.2.3 Etapa de producción

El proceso de producción de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, es similar para los dos hongos.

a) Aumento de biomasa a partir de las cepas activadas

- En cámara de flujo, se tomó una asada de la caja que contiene la cepa activada y se la colocó en una caja petri con PDA siguiendo la técnica de estriado.

Técnica microbiológica de estriado

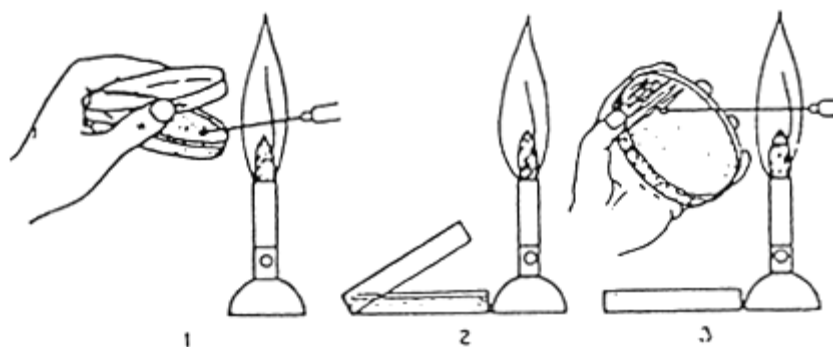


Figura 6. La Figura uno muestra la forma correcta para recoger la muestra de una caja Petri evitando contaminación, la figura dos muestra la posición adecuada en la que se debe colocar la caja Petri evitando contaminación externa y la figura 3 muestra la metodología idónea para estriar una caja con la muestra de cualquier microorganismo.

Fuente: (FAO, 2014)

- Se etiquetaron 10 cajas estriadas por cada hongo, indicando el microorganismo usado y la fecha de realización.
- Se sometieron a incubación durante 7 días a 27°C.

b) Elaboración del medio líquido PD (Papa Dextrosa)

- Se lavó, peló y troceó en cuadros una papa
 - Se pesaron 50g de papa y se colocaron en un recipiente con 125 ml de agua destilada.
 - Se dejó hervir en una hornilla eléctrica por 10 minutos.
 - Se coló el contenido en un Erlenmeyer de 250 ml y se aforó con agua destilada estéril + Tween 80 (por cada 1000 ml de Agua destilada se agregaron 5 gotas de Tween).
 - Se autoclavó, se retiró el material de la autoclave y se dejó enfriar hasta 45 °C.
 - En cámara de flujo se agregó ácido láctico al PD (Papa Dextrosa), para evitar contaminación bacteriana (por cada 500 ml de agua destilada se colocan 8 gotas de este producto).

c) Formación del inóculo

- Con una espátula, se incorporó al PD la totalidad del contenido de una caja esporulada con *Beauveria bassiana* o *Trichoderma harzianum* (depende la producción que se esté realizando)
- Se dejó en agitación por 4 días a 170 rpm (revoluciones por minuto) en un agitador orbital universal (ver anexo 10).

d) Sustratos para la producción de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*

Tabla 9.

Composición de sustratos a utilizar (tratamientos)

TRATAMIENTOS	SUSTRATOS	CANTIDADES
T0	Arroz 100%	Arroz 100 g
T1	Arroz 50% y arrocillo 50%	Arroz 50 g + arrocillo 50 g
T2	Arroz 95% y cascarilla de café 5%	Arroz 95 g + cascarilla de café 5 g
T3	Arroz 80% y bagazo de caña de azúcar 20%.	Arroz 80 g + bagazo de caña de azúcar 20g.

Nota: (Noboa & Quelal, 2014).

- Se pesó el equivalente a 15 fundas para cada tratamiento (1500g por tratamiento)
- Cada tratamiento se colocó en 1 gaveta estéril de 40cm de largo x 25 cm de ancho x 30 cm de alto.
- Se agregó a cada gaveta agua destilada a 70 °C (2 L de agua destilada por cada 1500g de sustrato).
- Se dejó en inmersión a los sustratos por 10 min y se agregaron 32 gotas de ácido láctico (16 gotas/L), permaneciendo inmersos 10 min más.
- Con una varilla de vidrio, se agitaron los sustratos cada 5 minutos durante 20 min para dar uniformidad al tratamiento.

e) Enfundado del sustrato

- Del total de la gaveta se dividieron en 15 fundas (100g por funda de propietileno)
- Se doblaron y graparon las fundas.
- Se autoclavarón 60 fundas a 121 °C por 15 minutos y una atmósfera de presión (15 por tratamiento).
- Se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente en gavetas estériles (ver anexo 11).

f) Inoculación e incubación de los tratamientos

- En cámara de flujo, se realizó un corte de 2 cm en el centro de cada funda.
- Con una jeringuilla sin aguja, se absorbieron 10ml del inóculo del hongo y se inyectaron en el sustrato.
- Se selló el corte con 4cm de cinta masking.
- Se agitó cada funda para homogenizar la inoculación.
- Las fundas inoculadas se trasladaron a incubación a 27 ° C durante 7 días (ver anexo 12).

g) Control de calidad por tratamiento

- Se pesó 1 g de sustrato colonizado y se colocó en 9ml de agua destilada con Tween 80 (150 µl en 1000ml).
- Se agitó en el vortex la muestra hasta que se desprenda el hongo del sustrato.
- Se vertió la dilución en un vaso precipitado con 300 ml de agua destilada.
- Se agitó la mezcla por 1 minuto en un agitador magnético.
- Se realizó el conteo en cámara de Neubauer (ver anexo 6).
- Se Registraron los valores de cada conteo

Tabla 10.

Formato de registro de conteos

T0 (arroz 100%)	Lecturas camara de Neubauer (por cada cuadrante)					Promedio por cámara	Promedio total
Funda 1	0	2	1	1	4	1,6	2,1
	2	1	4	4	2	2,6	
Funda 2	0	0	1	1	3	1	1,2
	0	2	1	3	1	1,4	

Nota: (Noboa & Quelal, 2014)

- Con la siguiente fórmula se obtuvo el valor de las esporas existentes por gramo de sustrato.

$$\text{Esporas por g. de producto} = \bar{x} * 25000 * 10 * 300$$

Dónde:

- $\bar{x}$ = Promedio de conteos en la cámara de Neubauer
- 25000 = Factor estándar de la cámara de Neubauer
- 10 = dilución inicial en tubo de ensayo.
- 300= dilución a la que se hace el conteo. (Báez, F., 2013, pág. 1).

2.2.2.4 Etapa de formulación y empaque

a) Secado de los tratamientos

- Se cortaron 4 pedazos de papel cartón de 30cm de ancho x 90cm de largo y se colocaron en la estufa a 100 °C por 20 minutos
- Los pedazos de papel se colocaron en la estantería de área de secado y se vertieron las 15 fundas de cada tratamiento.
- Se esparció cada tratamiento a lo largo y ancho del papel, formando una capa fina
- Se encendió el extractor de humedad alcanzando una temperatura de 24 °C y una humedad del 15%.
- Se dejó en secado a los tratamientos por 10 días. (ver anexo 13).

b) Formulaci3n del producto

- Se molieron los sustratos en molino convencional para disminuir el tama1o de la partcula.
- Se colocaron 0,5g de talco industrial por cada 10g de sustrato; es decir 257,15g de sustrato + 12,85 g de talco, dando un total de 270g de producto.
- La mezcla se ubic3 en fundas de papel est3riles y se graparon.
- Se introdujeron en una funda de aluminio, se sell3 y se colocaron las etiquetas respectivas. (ver anexo 14).

2.2.2.5 Etapa de conservaci3n

Conservaci3n de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, en aceite mineral y slica gel

a) Conservaci3n en aceite mineral

- Se colocaron 3ml de PDA (Agar Papa Dextrosa) en 18 tubos de ensayo de 8ml de capacidad y se dejaron solidificar.
- Se realiz3 una diluci3n del hongo esporulado con 9ml de agua destilada + tween 80 m3s una asada del hongo.
- Se agregaron 10 µl de la suspensi3n a cada tubo.
- Se dejaron en incubaci3n por 7 d3as a 27 °C.
- Se agreg3 1 ml de aceite mineral en cada tubo y se llevaron a refrigeraci3n a 4°C (ver anexo 15).

b) Conservaci3n en slica gel

- Se esterilizaron 18 tubos de ensayo de 8 ml de capacidad y se llen3 el 75% de su capacidad con slica gel sin indicador.
- Los tubos se colocaron en la estufa a 180 °C por 3 horas.
- Se realiz3 una diluci3n de los hongos esporulados.

- Se colocaron 10 µl de la suspensión en cada tubo y se dejaron en incubación por 7 días a 27 °C
- Los tubos se llevaron a refrigeración a 4 °C, hasta su reactivación (ver anexo 16).

c) Reactivación de los hongos conservados en aceite mineral

- Retirar los tubos del refrigerador
- Con una jeringa retirar el exceso de aceite mineral del cultivo y con agua destilada estéril lavar los residuos.
- Aislar con espátula estéril el hongo libre de aceite y depositarlo en cajas petri con PDA.
- Incubar durante 7 días a 27°C. (Gato, 2010, pág. 3)

d) Reactivación de los hongos conservados en sílica gel

- Tomar de 4 a 5 cristales de sílica gel, en un ambiente estéril y colocarlos sobre cajas petri con PDA.
- Sellar la caja, colocarla a 20°C durante 7 días. (Cadeño & Ames, 2004, págs. 45-47)

e) Control de calidad de la conservación

- Realizar el conteo en cámara de Neubauer (ver anexo 6)
- Seleccionar el método de conservación que mantuvo una concentración similar al conteo en control de calidad de producción (Báez, F., 2013, pág. 10), mediante la elaboración de un formato para registrar los datos.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Fase I: Diagnóstico de la infraestructura, materiales, equipos y procesos de producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, en el laboratorio de la AACRI.

3.1.1 Inspección y equipamiento del laboratorio de la AACRI

Adecuación e implementación de áreas y equipos en el laboratorio de la AACRI

Antes	Después
A 	B 
C 	D 

E



F



G



H

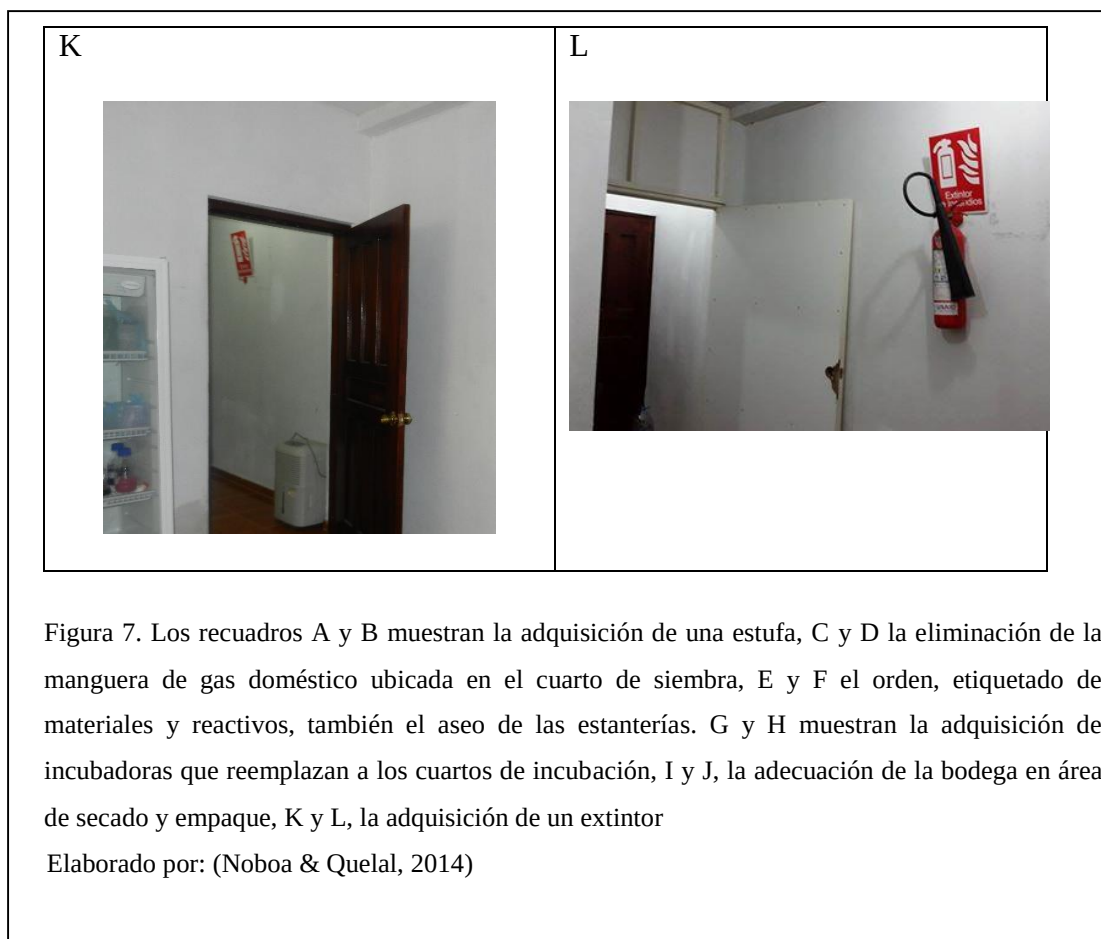


I



J





El laboratorio de la AACRI posee una superficie total de 369,6 m², cuenta con 2 cuartos de incubación, un cuarto de siembra, una oficina, baño, bodega, área de esterilización y área de trabajo (Ver Anexo 17).

En la figura 7, se observa en la columna izquierda los literales A, C, E, G, I y K el estado del laboratorio de la AACRI, sin la implementación de las mejoras expuestas en la realización del protocolo y en la columna derecha los literales B, D, F, H, J y L muestran la readecuación e implementación de áreas, la adquisición de nuevos equipos, los cuales favorecen a la adecuada ejecución del protocolo.

El laboratorio presentaba irregularidades a nivel de infraestructura, carencia de equipos, materiales y señalética, lo que afectaba a los procesos de producción.

Con la implementación de normas básicas de bioseguridad y el correcto manejo de riesgos mecánicos se mejoró significativamente el proceso de producción y el bienestar del personal que ahí labora. Todo esto basado en el Manual de Bioseguridad de la Organización Mundial de la Salud 2005, el cual según el trabajo

que se ejecuta en el laboratorio de la AACRI lo cataloga como un laboratorio Nivel 2 (Riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo). (Ver anexo 18)

3.1.2 Activación de la virulencia de *Beauveria bassiana*

Esporulación de *Beauveria bassiana* en brocas

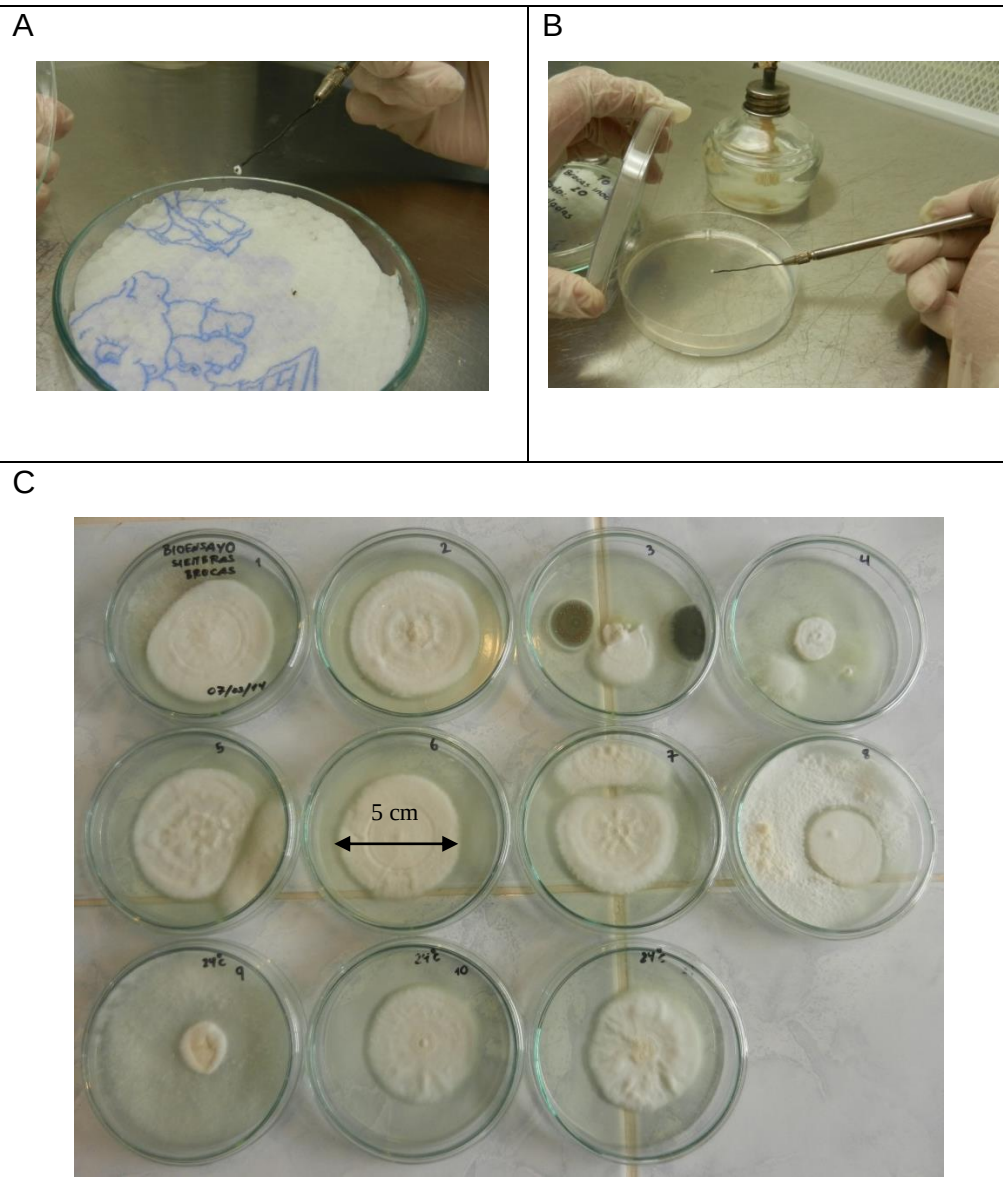


Figura 8. Fotografías de la esporulación de *Beauveria bassiana* en brocas y su posterior crecimiento micelial en cajas con medio PDA. En el recuadro A se observa una broca esporulada, en B el traspaso de la broca esporulada a medio PDA y en el C 11 cajas Petri donde esporuló *Beauveria bassiana*

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

De la figura 8, en el recuadro A se observa la extracción de la broca (*Hypothenemus hampei*) desde la cámara húmeda de una en la cual esporuló *Beauveria bassiana*. En el recuadro B se puede observar la colocación de la broca esporulada en medio PDA y en el recuadro C se observa que de las 11 cajas Petri donde se realizó el procedimiento de A y B hubo el crecimiento micelial de *Beauveria bassiana*, con un diámetro promedio de 5 cm y presentando contaminación en 6 de las 11 cajas Petri.

La esporulación presentada en las cajas coincide con lo descrito por (Ortiz, 2009, pág. 16), en donde señala que cuando el micelio presenta una textura algodonosa y una coloración blanca con una ligera tonalidad crema, se trata del hongo *Beauveria bassiana*.

El estudio realizado por González, Valencia, & Bustillo (2001, págs. 31-35), describe que cuando el hongo entomopatógeno entra en contacto con su blanco (broca del café), su mecanismo de ataque se activa, produciendo enzimas extracelulares tales como proteasa, lipasa y quitinasa involucradas en la penetración del integumento y éste a su vez le proporciona a *Beauveria bassiana* nutrimentos necesarios para su crecimiento (quitina), lo que provoca una mayor virulencia de la cepa.

3.1.3 Activación de la virulencia de *Trichoderma harzianum*

Prueba de antagonismo por disco dual entre *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum*



Figura 9. Fotografía del halo de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum* confrontados en una prueba de antagonismo por disco dual

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

En la figura 9, se observan 6 cajas Petri esporuladas, las 2 primeras de la parte superior constituyen los testigos de *Trichoderma harzianum*, a la izquierda y de *Fusarium oxysporum* a la derecha, de esta manera las 4 restantes muestran el resultado de la prueba de antagonismo por disco dual.

En las 2 cajas petri, identificadas como testigo, donde esporularon el hongo antagonista y el fitopatógeno, se encuentra que el halo de crecimiento es mayor al de las 4 cajas Petri donde se realizó la prueba por disco dual, esto se debe a que en estas cajas se sembró un solo disco de cada hongo, por lo tanto no tuvieron competencia por nutrimento o espacio lo que favorece su desarrollo, mientras que en las cajas donde se realizaron las pruebas de disco dual existió una confrontación de dos discos uno inoculado con *Trichoderma harzianum* y el otro con el fitopatógeno *Fusarium*

oxysporum, esto conllevó a que los dos hongos compitieran por nutrimentos y espacio limitando su crecimiento dentro de la caja, visualizándose también que en las 4 cajas el desarrollo de *Trichoderma harzianum* sobrepasó la mitad de la caja incluso esporulando sobre la colonia del fitopatógeno, cabe resaltar que el crecimiento micelial del fitopatógeno no sobrepasó la mitad de la caja Petri, lo que demuestra la efectividad del antagonista controlando y disminuyendo significativamente el desarrollo del fitopatógeno.

Según la escala de Bell (CET, 2004, pág. 12), la prueba de antagonismo por disco dual muestra que el hongo antagonista en estudio pertenece a la clase 2 la cual se menciona que *Trichoderma* spp., debe crecer al menos sobre las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo. El mismo autor considera que los aislamientos de *Trichoderma* spp., que estén en la clase 1 o 2 se consideran altamente antagonistas.

Tabla 11.

Medición por 7 días de los halos de crecimiento en diámetro Polar (vertical) y Ecuatorial (horizontal) de *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum* sometidos a la prueba de antagonismo por disco dual.

Antagonismo <i>Trichoderma harzianum</i> con <i>Fusarium oxysporum</i> por método de disco															
Halos de crecimiento en centímetros por día															
TESTIGOS	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Día 6		Día 7		Promedio de Crecimiento (cm)
	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	
<i>Trichoderma harzianum</i>	2	2	4	4	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	7,25
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	1	1	1	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	3,79
CAJA 1	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Día 6		Día 7		Promedio de Crecimiento (cm)
	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	
<i>Trichoderma harzianum</i>	2	2	4	4	7	7	8	8	9	8	9	8	9	8	6,63
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	1	1	1	2	2	4	3	4	3	4	3	4	3	2,50
CAJA 2	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Día 6		Día 7		Promedio de Crecimiento (cm)
	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	
<i>Trichoderma harzianum</i>	2	2	3	4	7	6	9	7	9	8	9	8	9	9	6,46
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	1	1	1	3	3	4	3	4	4	4	3	4	3	2,80
CAJA 3	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Día 6		Día 7		Promedio de Crecimiento (cm)
	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	
<i>Trichoderma harzianum</i>	2	3	3	4	7	6	7	6	9	7	9	8	9	9	6,38
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	1	1	1	3	3	4	3	4	3	4	3	4	3	2,71
CAJA 4	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5		Día 6		Día 7		Promedio de Crecimiento
	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	P	E	
<i>Trichoderma harzianum</i>	2	2	4	4	8	6	9	7	9	8	9	8	9	8	6,65
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	1	1	1	3	3	3	3	4	3	4	3	4	3	2,46
									<i>Trichoderma harzianum</i>						6,67
															73%
									<i>Fusarium oxysporum</i>						2,85
															27%

Nota: (Noboa & Quelal, 2014)

En la tabla 11, se observan los datos de la medición en centímetros durante siete días del halo de crecimiento de cada hongo, valorado en el diámetro polar (P) y ecuatorial (E), sometidos a la prueba de antagonismo por disco dual.

Así se puede visualizar que las cajas con los testigos alcanzaron los valores más altos para los dos hongos esto debido a que en estas cajas no existía una confrontación entre el antagonista y el fitopatógeno. De las cajas 1 a la 4 se observa que los promedios disminuyen con relación a promedio de los testigos, esto se debe a que en estas cajas hubo una confrontación entre los dos hongos, por ende una lucha por nutrientes y espacio.

El promedio de crecimiento de *Trichoderma harzianum* en las 4 cajas donde se desarrolló la prueba de antagonismo por disco dual, es de 6,67 cm equivalente al 73% del diámetro total de la caja petri. Así mismo, el promedio alcanzado por *Fusarium oxysporum* es de 2,62 cm equivalente al 27% del diámetro total de la caja petri el mismo que es 9 cm en su diámetro polar y ecuatorial (Ver anexo 19).

Resultado similar reporta (Fernández, 2009, pág. 4), quién halló en su trabajo un porcentaje de crecimiento de *Trichoderma harzianum* equivalente al 69,5% del total de la caja petri.

Según el mismo autor describe que *Trichoderma harzianum* es capaz de inhibir del crecimiento de fitopatógenos, porque produce numerosos antibióticos como la trichodermina, la suzukacilina, la alameticina, la dermadina, la penicilina, los trichotecenos, las trichorzianinas, entre otros. Concluyendo que probablemente los aislamientos antagónicos con los que se trabajó utilizaron este método de supresión contra el patógeno.

3.2 Fase II: Selección del método de producción y conservación para *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*

3.2.1 Producción de *Beauveria bassiana*

Crecimiento de *Beauveria bassiana* en cuatro diferentes sustratos



Figura 10. Fotografía de los 4 tratamientos con 15 fundas cada uno, donde esporuló el hongo *Beauveria bassiana*. Evidenciando contaminación o esporulación parcial en fundas de los tratamientos T1, T2 y T3. En T0 se visualiza esporulación completa en todas las fundas.

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Tabla 12.

Promedio de la concentración de esporas por gramo de sustrato de los cuatro tratamientos con *Beauveria bassiana*

T0	Lecturas cámara de Neubauer	M	M1	Esporas / g de producto	T1	Lecturas cámara de Neubauer	M	M1	Esporas / g de producto	T2	Lecturas cámara de Neubauer	M	M1	Esporas / g de producto	T3	Lecturas cámara de Neubauer	M	M1	Esporas / g de producto
F1	0 2 1 1 4 1,6 2 1 4 4 2 2,6		2,1	1,58E+08	F1	0 0 4 2 1 1,4 1 1 0 0 1 0,6		1	7,50E+07	F1	3 3 3 2 2 2,6 1 3 2 2 2 2		2,3	1,73E+08	F1	3 2 4 3 4 3,2 4 1 2 2 3 2,4		2,8	2,10E+08
F2	0 0 1 1 3 1 0 2 1 3 1 1,4		1,2	9,00E+07	F2	1 1 2 1 1 1,2 1 1 0 1 0 0,6		0,9	6,75E+07	F2	3 2 2 4 2 2,6 3 4 2 1 3 2,6		2,6	1,95E+08	F2	2 1 1 2 2 1,6 1 3 4 3 2 2,6		2,1	1,58E+08
F3	0 0 1 0 1 0,4 1 2 2 1 2 1,6		1	7,50E+07	F3	0 2 1 0 0 0,6 0 2 2 2 2 1,6		1,1	8,25E+07	F3	0 2 2 2 1 1,4 0 2 2 1 1 1,2		1,3	9,75E+07	F3	2 1 1 1 1 1,2 1 1 1 1 2 1,2		1,2	9,00E+07
F4	2 1 0 0 1 0,8 1 0 1 1 0 0,6		0,7	5,25E+07	F4	0 0 1 0 0 0,2 0 0 0 0 1 0,2		0,2	1,50E+07	F4	0 1 0 1 0 0,4 1 0 0 1 0 0,4		0,4	3,00E+07	F4	1 1 1 2 2 1,4 2 1 1 1 3 1,6		1,5	1,13E+08
F5	6 3 4 4 3 4 1 9 4 3 9 5,2		4,6	3,45E+08	F5	0 1 0 0 1 0,4 1 0 1 0 0 0,4		0,4	3,00E+07	F5	0 2 2 2 0 1,2 0 0 1 2 0 0,4		0,8	6,00E+07	F5	2 1 2 1 1 1,4 1 1 1 2 1 1,2		1,3	9,75E+07
F6	1 0 1 2 3 1,4 4 4 5 0 4 3,4		2,4	1,80E+08	F6	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		0	0,00E+00	F6	3 2 1 1 1 1,6 0 1 2 2 1 1,2		1,4	1,05E+08	F6	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		0	0,00E+00
F7	5 2 1 3 1 2,4 0 0 2 2 2 1,2		1,8	1,35E+08	F7	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		0	0,00E+00	F7	1 0 1 1 0 0,6 0 1 0 1 1 0,6		0,6	4,50E+07	F7	1 2 2 1 2 1,6 2 1 1 0 2 1,2		1,4	1,05E+08
F8	1 2 2 1 1 1,4 0 0 1 1 1 0,6		1	7,50E+07	F8	0 1 1 1 1 0,8 0 1 1 1 2 1		0,9	6,75E+07	F8	0 1 0 0 0 0,2 0 1 0 1 1 0,6		0,4	3,00E+07	F8	1 1 0 1 2 1 1 3 0 2 1 1,4		1,2	9,00E+07
F9	1 2 0 4 5 2,4 1 0 3 3 1 1,6		2	1,50E+08	F9	0 1 1 1 1 0,8 1 0 0 0 2 0,6		0,7	5,25E+07	F9	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		0	0,00E+00	F9	1 2 1 1 0 1 0 1 0 0 1 0,4		0,7	5,25E+07
F10	1 2 2 3 3 2,2 1 4 3 2 1 2,2		2,2	1,65E+08	F10	2 0 0 3 1 1,2 2 1 1 2 2 1,6		1,4	1,05E+08	F10	1 0 2 2 1 1,2 0 1 1 0 2 0,8		1	7,50E+07	F10	1 1 0 1 0 0,6 1 0 1 0 0 0,4		0,5	3,75E+07
F11	2 3 2 3 5 3 1 1 2 0 4 1,6		2,3	1,73E+08	F11	0 0 1 2 0 0,6 2 1 3 1 0 1,4		1	7,50E+07	F11	1 2 2 1 3 1,8 2 2 0 1 1 1,2		1,5	1,13E+08	F11	1 2 0 1 0 0,8 1 0 2 2 1 1,2		1	7,50E+07
F12	0 2 1 4 3 2 3 4 4 1 1 2,6		2,3	1,73E+08	F12	0 0 1 0 0 0,2 0 1 1 1 1 0,8		0,5	3,75E+07	F12	0 0 0 1 0 0,2 1 0 0 0 1 0,4		0,3	2,25E+07	F12	1 0 2 4 0 1,4 2 4 5 1 2 2,8		2,1	1,58E+08
F13	1 4 2 3 1 2,2 4 4 4 3 3 3,6		2,9	2,18E+08	F13	0 0 0 1 0 0,2 0 1 1 0 1 0,6		0,4	3,00E+07	F13	0 1 0 1 1 0,6 1 0 1 1 0 0,6		0,6	4,50E+07	F13	0 1 1 0 1 0,6 0 2 0 0 1 0,6		0,6	4,50E+07
F14	1 1 1 1 0 0,8 2 1 4 1 1 1,8		1,3	9,75E+07	F14	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		0	0,00E+00	F14	0 0 0 0 1 0,2 0 0 0 0 1 0,2		0,2	1,50E+07	F14	1 1 0 0 1 0,6 1 0 1 1 1 0,8		0,7	5,25E+07
F15	1 1 1 0 2 1 0 2 0 1 0 0,6		0,8	6,00E+07	F15	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0		0	0,00E+00	F15	0 0 1 0 0 0,2 0 0 0 1 0 0,2		0,2	1,50E+07	F15	0 0 2 2 2 1,2 2 0 0 0 1 0,6		0,9	6,75E+07
Promedio Número de esporas/ g de producto (T0)				1,43E+08	Promedio Número de esporas/ g de producto (T1)				4,25E+07	Promedio Número de esporas/ g de producto (T2)				6,80E+07	Promedio Número de esporas/ g de producto (T3)				9,00E+07

Nota: (Noboa & Quelal, 2014)

Dónde: F: funda, M: media, T0: arroz 100%, T1: arroz 50%, arrocillo 50%, T2: arroz 95%, cascarilla 5% y T3: arroz 80%, bagazo 20%

Promedio de recuento en ufc de *Beauveria bassiana*/g de sustrato de cada tratamiento

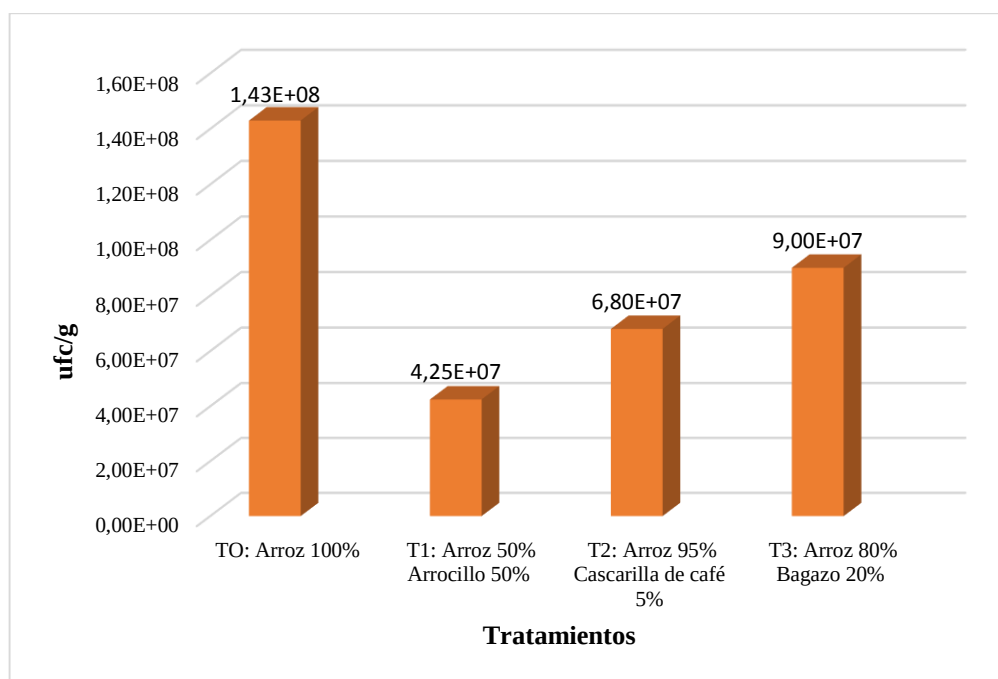


Figura 11. Representación gráfica mediante barras de los promedios alcanzados en la concentración de esporas por cada sustrato.

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

En la tabla 12, figura 10 y 11, indican que para *Beauveria bassiana*, de los 4 tratamientos analizados con 15 fundas cada uno, el que presentó un promedio mayor de concentración de esporas por gramo y en el cual se observó bajos niveles de contaminación fue T0 (Arroz 100%) con una concentración de $1,43 \times 10^8$, seguido por T3 con una concentración de 9×10^7 , T2 con una concentración de $6,8 \times 10^7$ y T1 con una concentración de $4,25 \times 10^7$.

Esto se debe posiblemente a que el sustrato T0 (Arroz 100%), proporciona al hongo un adecuado balance nutricional, y condiciones específicas acordes a los requerimientos del aislamiento en aireación y humedad, ya que el grano de arroz posee un alto porcentaje de hidratos de carbono, siendo su principal componente el almidón con un 77,4%. (Grabowski, Orrego, & Stauffer, 2005), afirman que los sustratos que contienen una buena fuente de glucosa (almidón) tienen una mayor producción de esporas. Así mismo el rendimiento obtenido coincide con el reportado por (Galán, Arévalo, Elías, Quintero, & Garandilla, 2013, pág. 264) donde muestra

valores menores a 1×10^{10} conidios x g de sustrato en arroz para *B. bassiana* en un medio de cultivo bifásico.

Según los mismos autores, para considerar un sustrato como idóneo para la producción de conidios de una cepa o aislado de un entomopatógeno debe tener una alta productividad y rendimiento, lo cual depende de un contenido alto de carbohidratos, nitrógeno, microelementos, vitaminas del complejo B y una concentración alta de iones necesarios para el crecimiento, esporulación y conservación de la patogenicidad de los hongos entomopatógenos. Lo anterior impactaría directamente en su uso potencial como fuentes de inóculo para controlar plagas de importancia agrícola.

3.2.2 Producción de *Trichoderma harzianum*

Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en cuatro diferentes sustratos



Figura 12. Fotografía de los 4 tratamientos con 15 fundas cada uno, donde esporuló el hongo *Trichoderma harzianum*. Evidenciando baja o parcial esporulación en las fundas de los tratamientos T0, T1 y T2. En T3 se observa esporulación completa en todas las fundas.

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Tabla 13.

Promedio de la concentración de esporas por gramo de sustrato de los cuatro tratamientos con *Trichoderma harzianum*

T0	Lecturas cámara de Neubauer	M	M1	Esporas / g de producto	T1	Lecturas cámara de Neubauer	M	M1	Esporas / g de producto	T2	Lecturas cámara de Neubauer	M	M1	Esporas / g de producto	T3	Lecturas cámara de Neubauer	M	M1	Esporas / g de producto
F1	3 5 3 10 4 5	5,8		1,45E+08	F1	3 0 2 2 3 2	1,8		4,50E+07	F1	0 2 2 0 0 0,8	0,9		2,25E+07	F1	2 4 1 8 6 4,2	5,4		1,35E+08
	5 8 5 9 6 6,6					2 2 1 2 1 1,6					1 1 2 0 1 1					5 7 6 9 6 6,6			
F2	4 8 4 4 5 5	5,2		1,30E+08	F2	1 0 1 1 2 1	1,1		2,75E+07	F2	0 2 1 3 1 1,4	2		5,00E+07	F2	10 7 8 10 8 8,6	11,3		2,83E+08
	4 6 3 7 7 5,4					2 2 0 1 1 1,2					0 3 2 6 2 2,6					17 13 11 18 11 14			
F3	4 7 5 7 8 6,2	6,6		1,65E+08	F3	2 0 1 0 0 0,6	0,7		1,75E+07	F3	3 1 5 5 4 3,6	3,3		8,25E+07	F3	9 6 7 9 8 7,8	6,8		1,70E+08
	4 6 6 5 14 7					0 1 1 1 1 0,8					2 3 3 4 3 3					7 5 5 4 8 5,8			
F4	4 8 12 13 8 9	14,3		3,58E+08	F4	0 0 2 2 1 1	1,3		3,25E+07	F4	0 3 4 1 3 2,2	3		7,50E+07	F4	3 3 7 6 10 5,8	5,7		1,43E+08
	19 22 20 17 19,6					0 3 0 2 3 1,6					6 2 5 2 4 3,8					5 8 5 5 5 5,6			
F5	5 3 2 2 0 2,4	3,1		7,75E+07	F5	2 1 0 2 1 1,2	0,9		2,25E+07	F5	2 1 1 2 2 1,6	1		2,50E+07	F5	14 13 15 19 19 16	17,1		4,28E+08
	3 4 4 5 3 3,8					0 1 0 2 0 0,6					0 1 0 0 1 0,4					20 18 15 20 18 18,2			
F6	1 3 2 1 1 1,6	1,5		3,75E+07	F6	1 1 0 0 1 0,6	0,6		1,50E+07	F6	1 2 1 1 5 2	1,9		4,75E+07	F6	4 4 7 7 8 6	5,4		1,35E+08
	3 2 1 0 1 1,4					0 1 1 1 0 0,6					1 1 2 3 2 1,8					8 5 3 3 5 4,8			
F7	6 2 1 2 1 2,4	2,3		5,75E+07	F7	1 2 1 1 2 1,4	1,4		3,50E+07	F7	2 1 2 1 2 1,6	2,1		5,25E+07	F7	9 13 13 15 14 12,8	15,2		3,80E+08
	1 2 4 2 2 2,2					4 0 1 0 2 1,4					3 2 3 2 3 2,6					25 16 19 18 10 17,6			
F8	4 1 3 0 1 1,8	2,4		6,00E+07	F8	1 3 2 4 3 2,6	2,5		6,25E+07	F8	3 5 2 3 4 3,4	3,1		7,75E+07	F8	10 15 21 22 21 17,8	17,3		4,33E+08
	4 1 6 2 2 3					2 3 1 2 4 2,4					5 2 3 1 3 2,8					15 17 15 20 17 16,8			
F9	1 2 0 2 1 1,2	1,7		4,25E+07	F9	0 2 2 3 1 1,6	1,7		4,25E+07	F9	1 1 1 0 1 0,8	1,1		2,75E+07	F9	13 8 7 7 14 9,8	11		2,75E+08
	4 3 1 1 2 2,2					1 1 3 0 4 1,8					0 1 1 3 2 1,4					13 9 9 19 11 12,2			
F10	5 5 4 3 3 4	6,3		1,58E+08	F10	5 2 4 7 11 5,8	6,3		1,58E+08	F10	0 0 0 1 2 0,6	1,2		3,00E+07	F10	4 4 4 5 8 5	5,9		1,48E+08
	9 11 3 9 11 8,6					4 9 9 3 9 6,8					1 2 1 4 1 1,8					8 7 9 3 7 6,8			
F11	4 6 2 5 4 4,2	4		1,00E+08	F11	4 3 4 3 4 3,6	4		1,00E+08	F11	2 3 3 2 4 2,8	1,9		4,75E+07	F11	7 6 10 7 10 8	8,5		2,13E+08
	3 4 3 5 4 3,8					4 4 3 6 5 4,4					1 1 1 2 0 1					14 8 10 7 6 9			
F12	4 5 3 3 1 3,2	3,5		8,75E+07	F12	2 4 2 3 1 2,4	2,6		6,50E+07	F12	2 3 3 2 4 2,8	3,6		9,00E+07	F12	1 3 3 4 5 3,2	4,3		1,08E+08
	5 6 2 3 3 3,8					2 3 3 3 3 2,8					7 4 2 3 6 4,4					3 4 3 8 9 5,4			
F13	4 6 7 3 4 4,8	3,7		9,25E+07	F13	1 0 1 1 1 0,8	2,3		5,75E+07	F13	1 3 4 1 5 2,8	2,2		5,50E+07	F13	12 9 10 13 9 10,6	11,4		2,85E+08
	3 5 2 1 2 2,6					5 1 5 5 3 3,8					1 3 0 1 3 1,6					11 9 11 16 14 12,2			
F14	3 5 4 3 1 3,2	3,2		8,00E+07	F14	4 1 4 2 3 2,8	2,8		7,00E+07	F14	1 1 2 1 0 1	1,5		3,75E+07	F14	8 10 11 11 12 10,4	10,4		2,60E+08
	3 4 2 4 3 3,2					3 1 2 4 4 2,8					0 3 4 0 3 2					11 9 10 9 13 10,4			
F15	2 1 0 1 2 1,2	2,2		5,50E+07	F15	2 1 5 2 0 2	2,8		7,00E+07	F15	1 2 1 3 4 2,2	1,8		4,50E+07	F15	7 9 7 10 8 8,2	9,1		2,28E+08
	3 4 6 2 1 3,2					2 3 3 4 6 3,6					1 1 2 1 2 1,4					8 9 8 12 13 10			
Promedio Número de esporas/ g de producto (T0)				1,10E+08	Promedio Número de esporas/ g de producto (T1)				5,47E+07	Promedio Número de esporas/ g de producto (T2)				5,10E+07	Promedio Número de esporas/ g de producto (T3)				2,41E+08

Nota: (Noboa & Quelal, 2014)

Promedio de recuento en ufc de *Trichoderma harzianum*/g de sustrato de cada tratamiento

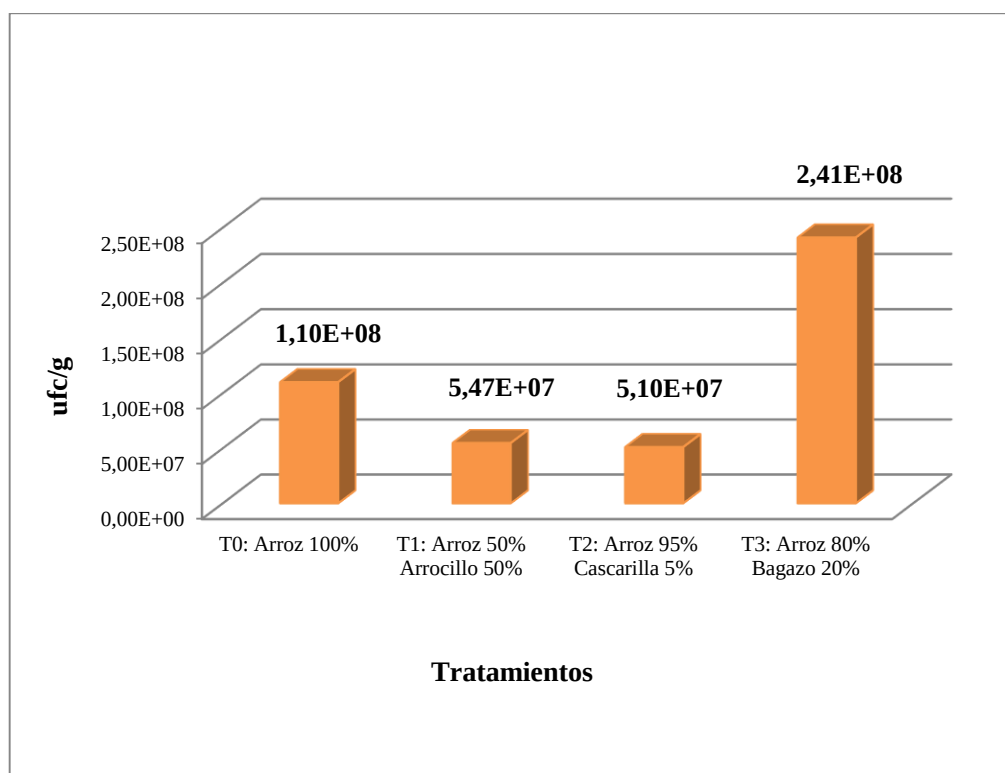


Figura 13. Representación gráfica mediante barras de los promedios alcanzados en la concentración de esporas por cada sustrato.

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

La tabla 13, figura 12 y 13, indican que para *Trichoderma harzianum*, de los 4 tratamientos analizados con 15 fundas cada uno, el que presentó un promedio mayor de concentración de esporas y en el cual se observó bajos niveles de contaminación fue T3 (Arroz 80% y Bagazo 20%) con una concentración de $2,41 \times 10^8$, seguido por T0 con una concentración de $1,10 \times 10^8$, T1 con una concentración de $5,47 \times 10^7$ y T2 con una concentración de $5,10 \times 10^7$.

La condición para que T3 fuera el mejor tratamiento para la esporulación de las conidias de *Trichoderma harzianum*, debió ser probablemente la porosidad que presentó el sustrato; así como la gran cantidad de azúcares que posee el bagazo de

caña como el arroz, lo que conllevó a que el hongo obtuviera una gran cantidad de nutrientes para su óptimo crecimiento.

Los resultados obtenidos se corroboran con un estudio realizado por (Valiño, Elías, Carrasco, & Nereida, 2003, pág. 48), donde indican que la fibra del bagazo sin microbiota natural, es decir cuando ha sido esterilizada en autoclave expresa mejor el potencial hidrolítico y desarrollo de la cepa.

El sustrato que menor concentración tuvo fue T2 (Arroz 95% y Cascarilla de café 5%) ya que (Aceves, 2008, pág. 188), menciona que la cascarilla de café posee metabolitos secundarios como ácido fórmico y/o acético, entre otros; lo que conlleva a una acción negativa sobre la viabilidad de esporas.

3.2.3 Implementación de mejoras del proceso de producción de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* de la AACRI.

Comparación de los métodos de producción de la AACRI con el protocolo implementado

Producción de la AACRI	Implementación del Protocolo
A 	B 

C



D



E



F



G



H





Figura 14. Recuadros donde se observa las fotografías de los procesos con los que trabajaba la AACRI y los procesos que lograron mejorar la producción y por ende la concentración de esporas de cada hongo.

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

En la figura 14, se observa la mejora en la concentración de esporas de los dos hongos comparando el método de producción con el que se manejaba la AACRI con el protocolo implementado en la investigación. El recuadro A y B, muestran el proceso de formación del inóculo, C y D, la metodología para inocular el sustrato, E y F, el área donde se incuban los sustratos ya inoculados, G y H, el sustrato esporulado después de 7 días, I y J, la readecuación de la bodega en área de secado y empaque, demostrando que con el proceso nuevo se logró conseguir una mejora significativa en la producción de los hongos en estudio.

3.2.4 Conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*

Tabla 14.

Tubos en conservación por tres meses

Conservación en Sílica Gel		Conservación en Aceite Mineral	
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
A	B	C	D
			

Nota: (Noboa & Quelal, 2014)

En la tabla 14, se observa en el recuadro A la esporulación de *Beauveria bassiana* en sílica gel, el recuadro B muestra la esporulación de *Trichoderma harzianum* en sílica gel, en recuadro C y D se observa la esporulación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* respectivamente en aceite mineral, los hongos mantuvieron sus características en los dos métodos. Sin embargo *Beauveria bassiana* presentó signos de contaminación en la mayoría de tubos conservados en aceite mineral.

El estudio de conservación se realizó en tubos de ensayo ya que los tubos, a pesar de tener una superficie mucho más reducida, ofrecen seguridad en su manipulación y buena resistencia a la deshidratación y a la contaminación. Se utilizan para conservar cultivos por tiempo más o menos prolongado, mientras que las cajas son más fáciles de contaminarse y se utilizan para trabajos rutinarios de aislamientos, aspecto del cultivo, velocidad de crecimiento y otros (Cadeño & Ames, 2004, pág. 19).

3.2.4.1 Conservación en sílica gel de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*



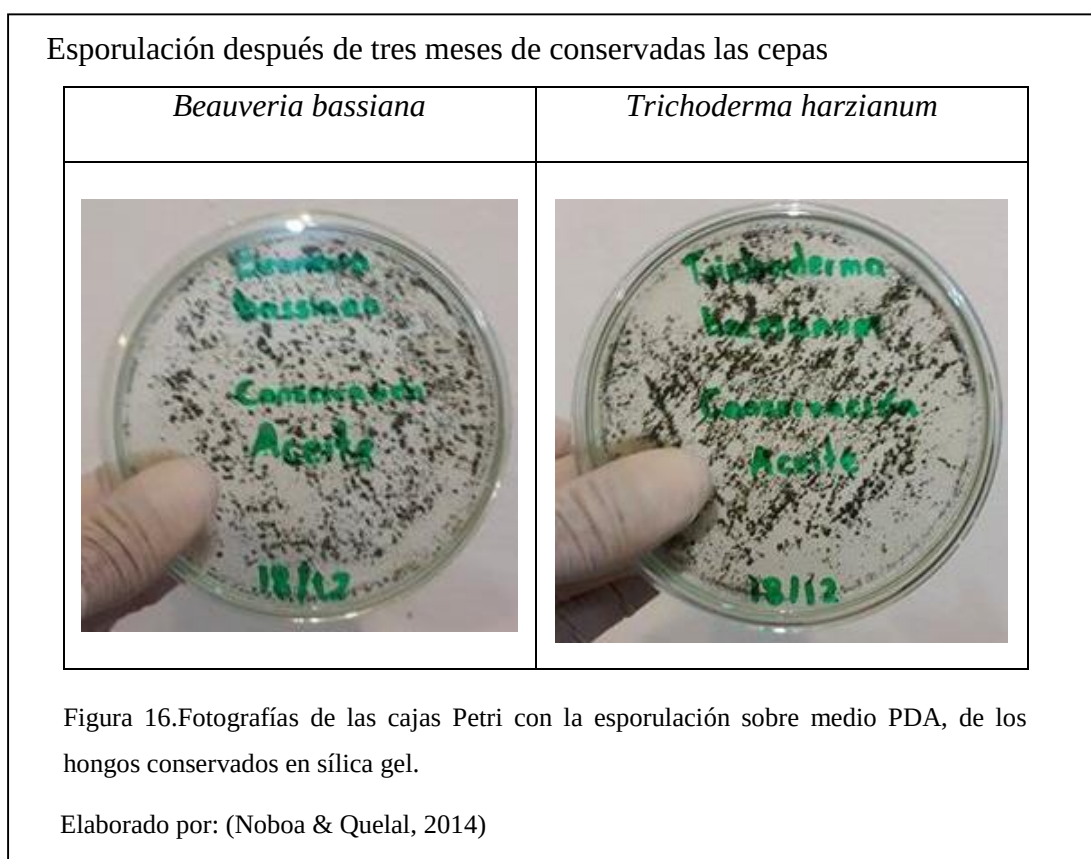
Pasados tres meses desde el proceso de conservación, se realizó la reactivación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* en medio PDA. La conservación en sílica gel presenta buenos resultados como se observa en la figura 15, ya que hubo crecimiento de colonias de ambos hongos. Se observan colonias de color blanco y colonias verdes para cada hongo respectivamente.

Los tubos de conservación en sílica gel no presentaron ningún tipo de contaminación visible, tampoco hubo aglomeración en el contenido (Sílica + inóculo), lo que indica que no hubo cambios en la humedad de los tubos.

La sílica gel sin indicador (no tóxica), ofrece gran capacidad de adsorción de humedad, evitando problemas ocasionados por ambientes húmedos e inestables que

son responsables de daños por: corrosión, mal olor, putrefacción, cambio de aspecto. Está libre de plomo, metales pesados y DMF (Dimetil fumarato), con una humedad relativa de $\leq 3 \%$ (Quiminet, 2012, p. 1). En el estudio realizado por (Sosa, Sarmiento, & Noda, 2004, p. 445) se demuestra que la sílica gel mantuvo las características de las cepas, indicando que la estabilidad genética no se vio afectada. Además la conservación en sílica gel eliminó los subcultivos frecuentes de las cepas (cada tres meses) y garantizó así la viabilidad de estas hasta el año. Las cepas estudiadas mantuvieron sus características culturales y micromorfológicas, así como la producción de ácido o álcali después de permanecer conservadas por un año en sílica gel (Sosa, et al., 2004, p.446).

3.2.4.2 Conservación en aceite mineral de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*



En la figura 16 se observa la esporulación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* en medio PDA, procedentes de los tubos conservados por el método de aceite mineral. Se evidencia claramente que en la caja de *Beauveria bassiana* no

hubo crecimiento de este hongo, sino que se presentó una contaminación cruzada de *Trichoderma harzianum*, esto probablemente se debe a la presencia de esporas en el ambiente que lograron penetrar en el medio donde se había sembrado *Beauveria bassiana*, logrando una inhibición por completo del desarrollo del hongo en cuestión.

Gams y Bisset dicen que la estructura mucilaginosa de *Trichoderma* retiene humedad, entonces al estar en un medio acuoso las probabilidades de que siga creciendo aumentan. Sin embargo bajo este método se garantizó la viabilidad de la cepa *Trichoderma harzianum* durante un año, sin sufrir cambios en su morfología y su capacidad antagónica. Posiblemente esto se debe al rango de temperatura y clima donde se realizaron los estudios. Se menciona también que este método es comúnmente usado para la conservación de hongos entomopatógenos, pero *Beauveria bassiana* en este caso no se conservó y en el proceso de reactivación no creció, desarrollándose en su lugar *Trichoderma harzianum* como contaminante. (Gato, 2010, pág. 192)

3.3 Fase III: Redacción del protocolo de producción y conservación.

Tabla 15.

Protocolo de Producción de *Beauveria bassiana*

Actividad	Materiales y Equipos	Área Específica
1. Control de calidad de la materia prima	Arroz (grano entero)	Cocina (Área de esterilización)
2. Elaboración de PDA	- PDA comercial * - Agua destilada -Ácido láctico -Hot Plate -Balanza	Área de Trabajo
3. Formación de biomasa	- Hongo esporulado en caja petri -Asa -Caja petri con PDA -Marcador	Cámara de flujo
4. Obtención del Inóculo (PD)	-Papa * -Azúcar -Agua destilada estéril -1 caja con hongo esporulado -Ácido láctico -Balanza	Área de Trabajo Cámara de flujo
5. Preparación del sustrato (Arroz 100%)	-Arroz -Agua -Ácido láctico	Cocina (Área de esterilización) Área de Trabajo
6. Enfundado del sustrato	-Fundas transparentes de propioetileno * -Grapadora	Cocina (Área de esterilización)
7. Inoculación del sustrato	- PD -Bisturí -Jeringuilla (10 ml) -Cinta adhesiva (masking 2,5cm ancho) -Tijera	Cámara de flujo
8. Incubación del sustrato inoculado	-Incubadora	Área de Trabajo
9. Control de Calidad	-Microscopio -Cámara de Neubauer -Cubreobjetos -Pipeta Volumétrica -Puntas o tips	Área de Trabajo

10. Secado de sustrato	-Papel cartón -Deshumidificador	Área de Empaque y Secado
11. Empaque y almacenamiento	-Fundas de papel -Empaques metálicos -Adhesivos	Área de Empaque y Secado

Nota: (Noboa & Quelal, 2014)

Recordatorio 1: Los ítems donde se encuentra el signo (*) son procesos que requieren de autoclave a 121 °C por 15 minutos y una atmósfera de presión.

3.3.1 Detalle del proceso de producción de *Beauveria bassiana*

a) Control de calidad de la materia prima y empaques

- Adquirir 1qq de Arroz Rico
- Verificar el buen estado del grano mediante la fricción con los dedos (El grano de arroz no debe quebrarse, debe tener un aspecto sano, libre de patógenos y homogéneo en color)
- Corroborar que las fundas de propietileno, de papel y de aluminio se encuentren en buen estado, sin agujeros, manchas o cualquier signo de alteración.

b) Elaboración de PDA (Agar Papa Dextrosa)

- La elaboración de PDA se debe realizar de acuerdo a las cantidades sugeridas en el envase (39 g en 1L) y a las necesidades del laboratorio, utilizando una regla de tres simple, así:

$$\begin{array}{ccc}
 39\text{g} & \xrightarrow{\div} & 1000\text{ml (1L)} \\
 & \nwarrow \times & \\
 X=11,7\text{g} & & 300 \text{ ml}
 \end{array}$$

Una vez determinada la cantidad necesaria a prepararse:

- Colocar el agua destilada en un frasco Boeco (graduado con tapa azul) y ponerlo sobre el hot plate con un agitador magnético (200° C y en el número 7 para agitación).

- Pesar la cantidad necesaria de PDA en la balanza y vaciarlo en el frasco.
- Dejar hervir por un minuto para disolver todas las partículas.
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos y una atmósfera de presión.
- Dejar enfriar hasta que el calor sea soportable con la mejilla.
- Agregar ácido láctico (revisar recordatorio 2).
- Dentro de cámara de flujo, dispensar en cajas petri de plástico o vidrio (Por cada 300ml de PDA se obtienen de 20 a 25 cajas).
- Dejar solidificar dentro de la cámara.
- Llevar las cajas a refrigeración a 4 °C, hasta su próximo uso.

Recordatorio 2: Por cada 500 ml de agua destilada se colocan 8 gotas de ácido láctico. Agregar la cantidad necesaria utilizando la misma regla de tres con los valores que se requieran.

c) Aumento de biomasa

A partir de las cajas esporuladas que se encuentran en refrigeración, se deben sacar replicas para poder alcanzar un proceso productivo constante.

- Colocar en la gaveta estéril los materiales necesarios: Caja petri con *Beauveria bassiana* esporulada y sin contaminación, cajas petri con PDA, asa, mechero y papel aluminio, para ingresar a la Cámara de flujo.
- Con el asa tomar una porción suficiente del hongo y colocar en la caja petri con PDA siguiendo la técnica de estriado.
- Etiquetar todas las cajas que se hayan estriado indicando el microorganismo utilizado y la fecha.
- Someter a incubación colocando las cajas boca abajo y de forma ordenada, evitando al máximo cualquier tipo de contaminación
- A los 7 días de incubación, se puede ya utilizar la biomasa existente en las cajas, o, mantener en refrigeración hasta que se necesite.

Recordatorio 2: Las gavetas se esterilizan, flameando toda su superficie mediante la aspersión de alcohol potable sobre un mechero de alcohol encendido.

d) Realización del Inóculo con PD (Papa Dextrosa) líquido

- Lavar, pelar y trocear en cuadros una papa
- Pesar 50g de la papa y colocar en un recipiente con 125 ml de agua destilada.
- Someter a calor en la hornilla eléctrica de 8-10 minutos.
- Cernir el contenido en un matraz de 250 ml.
- Aforar hasta completar el volumen indicado con agua destilada estéril + Tween.
- Autoclavar
- Dejar enfriar hasta que el calor sea soportable con la mano.
- Ingresar a cámara con el PD y una caja petri totalmente esporulada.
- Dentro de cámara agregar ácido láctico necesario (revisar recordatorio 3) y raspar completamente la caja con la espátula y colocarlo dentro del PD.
- Dejar en agitación por 4 días a 170 rpm (revoluciones por minuto).

Recordatorio 3: Por cada 1000 ml (1L) de Agua Destilada se deben agregar 5 gotas de Tween 80 y Autoclavar, dejar enfriar para utilizarlo.

e) Preparación del sustrato

- Pesar la cantidad que se necesite de arroz (100g por funda) y enseguida poner a hervir agua de acuerdo a lo que se ha pesado. (2 litros de agua por 1,5 kilos de arroz).
- Colocar en una gaveta limpia el arroz ya pesado.
- Agregar el agua hervida y caliente en la gaveta, cubriendo totalmente al arroz.
- A los 10 minutos de puesta el agua colocar 16 gotas de ácido láctico (revisar recordatorio 2).
- Dejar el agua por 10 minutos más y cernir enseguida.

f) Enfundado del sustrato

Una vez retirada el agua del sustrato se procede a pesarlo en fundas.

- Colocar 115g de arroz por funda (recordatorio 4).

- Doblar la funda de forma ordenada, conservando un poco de aire dentro de ella y grapar.
- Autoclavar
- Dejar enfriar en gavetas previamente flameadas y con el ventilador encendido para optimizar el tiempo.

Recordatorio 4: El peso húmedo del arroz aumenta en un promedio de 15g.

g) Inoculación del sustrato

- Tomar las gavetas con los sustratos autoclavados y llevarlos a cámara.
- Ingresar el inóculo que estuvo en agitación durante 48 horas listo, una jeringuilla de 10 ml, bisturí, masking y una tijera.
- Previo a empezar el proceso de inoculación, es necesario cortar el masking en varios trozos de 5-7 cm con la tijera y dejarlos cerca de la cámara.
- Colocar el Inóculo que está en un matraz en un vaso de precipitación para facilitar la absorción del mismo.
- Realizar un pequeño corte en la parte central de la funda con el bisturí.
- Tomar de 8-10 ml de inóculo y esparcirlos en la funda.
- Sellar el orificio con un trozo de masking.
- Agitar.

h) Incubación del sustrato inoculado

Enseguida de la inoculación, las fundas deben llevarse a su respectiva incubadora. La incubadora debe estar a una temperatura de 27° C. El proceso de incubación dura 7 días.

- Dentro de la incubadora, las fundas se deben colocar de forma ordenada y con el corte hacia arriba, para evitar que se contaminen.
- Cerrar correctamente la incubadora.
- Agitar todas las fundas cada tres días, mientras dura el proceso de incubación.
- Si se observa algún signo de contaminación en una o varias fundas, éstas deben ser eliminadas.

i) Control de Calidad

El proceso de control de calidad se realiza una vez culminado correctamente el período de incubación.

- Pesar 1g de sustrato esporulado de una funda y agregarlo a un tubo de ensayo con 9ml de agua destilada + tween.
- Agitar la dilución en el vortex para facilitar la liberación de la espora.
- Verter el contenido del tubo en un vaso de precipitación con 300 ml de agua destilada.
- Limpiar la cámara de Neubauer con alcohol y cubrirla con un cubreobjetos también limpio.
- Tomar 20 μ l (microlitros) con la pipeta volumétrica de 10-100 μ l y colocarlos en la celda inferior derecha y 20 μ l más, para colocarlos en la celda superior izquierda. (foto)
- Dejar reposar por un minuto para que se decanten las esporas.
- Colocar la cámara de Neubauer en el microscopio y con el lente 10x se procede a enfocar.
- Contar las esporas con el lente 40x en las celdas que se indican (ver anexo 6).
- Registrar los valores obtenidos de forma ordenada y clara para cada una de las celdas.
- Obtener un promedio de todas las lecturas (ver tabla 10).
- Con la siguiente fórmula se obtiene un valor de las esporas existentes en el sustrato.

$$\text{Esporas por g. de producto} = \bar{x} * 25000 * 10 * 300$$

Dónde:

- $\bar{x}$ = Promedio de conteos en la cámara de Neubeauer
- 25000 = Factor estándar de la cámara de Neubeauer
- 10 = dilución inicial en tubo de ensayo.
- 300= dilución a la que se hace el conteo.

j) Secado del sustrato

Previo al proceso de secado se debe colocar en la estufa pedazos de papeles de acuerdo al tamaño de la estantería.

- Colocar el papel bien seco en cada uno de los espacios de la estantería y encender el deshumificador al 60%, revisándolo periódicamente para eliminar el agua absorbida del ambiente.
- Abrir las fundas que contienen el sustrato y regarlo sobre el papel.
- Mover el sustrato de forma que quede una capa delgada de este sobre todo el papel.
- Dejar el sustrato durante 7 días en el cuarto de empaque, con períodos de luz y oscuridad (día y noche) a una temperatura entre 23 - 25 °C.

k) Formulación del producto y Almacenamiento

- Moler los sustratos para disminuir el tamaño de la partícula
- Colocar 0,5g de talco industrial por cada 10g de sustrato; es decir 257,15g de sustrato + 12,85 g de talco, dando un total de 270g de producto.
- Ubicar la mezcla en fundas de papel estériles y grapar
- Luego introducir la funda en un empaque de aluminio.
- Sellar y colocar las etiquetas respectivas.
- Conservar el producto final en las estanterías de la misma área a temperatura ambiente.

Tabla 16

Protocolo de Producción de *Trichoderma harzianum*

Actividad	Materiales y Equipos	Área Específica
a) Elaboración de PDA	-PDA comercial * -Agua destilada -Ácido láctico -Hot plate, balanza	Área de trabajo
b) Formación de biomasa	- Hongo esporulado en caja petri -Asa -Caja petri con PDA -Marcador	Cámara de flujo
c) Realización del Inóculo (PD)	-Papa * -Azúcar -Agua destilada estéril -1 caja con hongo esporulado -Ácido láctico -Balanza	Área de trabajo Cámara de flujo
d) Preparación del sustrato (Arroz 80% y Bagazo de caña 20%)	-Arroz 80% -Bagazo20% -Agua -Ácido láctico	Cocina Área de trabajo
e) Enfundado del sustrato	-Fundas transparentes de * propioetileno -Grapadora	Cocina
f) Inoculación del sustrato	- PD -Bisturí -Jeringuilla (10 ml) -Cinta adhesiva (masking 2,5cm ancho), tijera.	Cámara de flujo
g) Incubación del sustrato inoculado	-Incubadora	Área de trabajo
h) Control de Calidad	-Microscopio -Cámara de Neubauer -Cubreobjetos (1) -Pipeta volumétrica, tips.	Área de trabajo
i) Secado de sustrato	-Papel cartón -Deshumidificador	Área de empaque y secado
j) Empaque	-Fundas de papel, adhesivos -Empaques metálicos	Área de empaque y secado

Nota: (Noboa & Quelal, 2014).

3.3.2 Detalle del proceso de producción de *Trichoderma harzianum*

a) Preparación del sustrato

- Pesar la cantidad que se necesite de arroz y bagazo (100g por funda), es decir 80g de arroz y 20g de bagazo de caña cortado y enseguida poner a hervir agua de acuerdo a lo que se ha pesado (2 litros de agua por 1,5 kilos del sustrato).
- Colocar en una gaveta limpia el arroz ya pesado. Y en otra el bagazo
- Agregar el agua hervida y caliente en cada gaveta, cubriendo totalmente al arroz y al bagazo
- A los 10 minutos de puesta el agua colocar 16 gotas de ácido láctico (revisar recordatorio 1).
- Dejar el agua por 10 minutos más y cernir enseguida.

b) Secado del sustrato

Previo al proceso de secado se debe colocar en la estufa pedazos de papeles de acuerdo al tamaño de la estantería.

- Colocar el papel bien seco en cada uno de los espacios de la estantería y encender el deshumificador al 60%, revisándolo periódicamente para eliminar el agua absorbida del ambiente.
- Abrir las fundas que contienen el sustrato y regarlo sobre el papel cartón estéril.
- Mover el sustrato de forma que quede una capa delgada de este sobre todo el papel.
- Dejar el sustrato durante 10 días en el cuarto de empaque, con períodos de luz y oscuridad (día y noche) a una temperatura entre 18-20°C.

Observación: Los pasos para la producción de *Trichoderma harzianum* son los mismos que se utilizaron en la producción de *Beauveria bassiana*, por lo tanto se debe seguir cada uno de ellos. Cambiar el proceso en la preparación del sustrato y secado como se detalla anteriormente

3.3.3 Protocolo de conservación en sílica gel de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*

a) Proceso de conservación

- Esterilizar tubos de ensayo de 8 ml de capacidad y llenarlos el 75% de su capacidad con sílica gel sin indicador.
- Colocar los tubos en la estufa a 180 °C por 3 horas.
- Realizar una dilución de los hongos esporulados, agregando una asada de biomasa a un tubo de ensayo con 9ml de agua destilada + tween.
- Colocar 10 µl de la suspensión en cada tubo y dejar en incubación por 7 días a 27°C.
- Llevar los tubos a refrigeración a 4 °C, hasta su reactivación.

b) Reactivación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* conservados en sílica gel

- En la cámara de flujo, tomar de 4 a 5 cristales de sílica gel y colocarlos sobre cajas petri con PDA.
- Colocar las cajas a 20°C durante 7 días.
- Realizar el control de calidad respectivo.

3.4 Fase IV: Socialización con los miembros de la AACRI sobre el buen uso de este protocolo.

Capacitación a los técnicos encargados de la producción y conservación de microorganismos en el laboratorio de la AACRI



Figura 17: Fotos de la capacitación que se realizó al personal de la AACRI de todos los procesos expuestos en el protocolo

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

En la figura 17, se observa el proceso de capacitación del protocolo desarrollado a la persona encargada de la producción en el laboratorio de la AACRI. Dentro de la capacitación se incluyó normas de bioseguridad, equipo de protección personal, reconocimiento de materiales y reactivos así como el adiestramiento de todo el proceso de producción y conservación inmersos en el protocolo.

Socialización del protocolo con el directorio de la AACRI

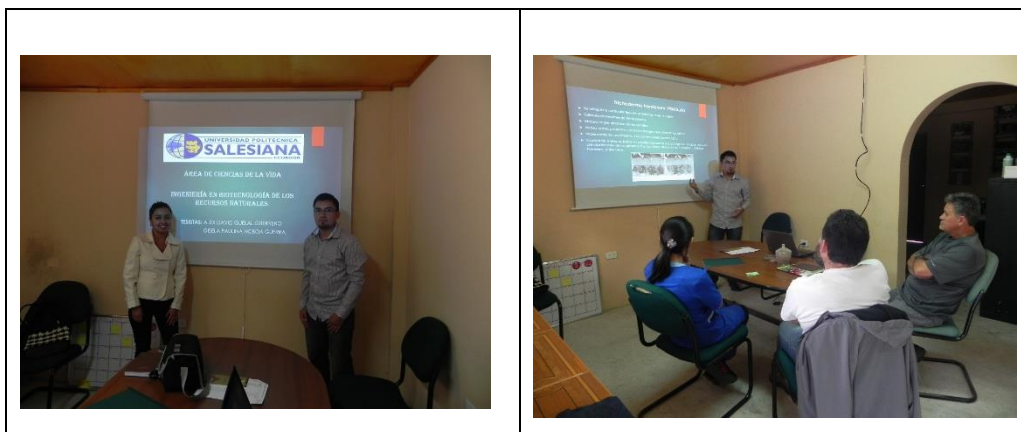


Figura 18. Fotografías de la exposición realizada al personal de la AACRI, donde se socializó el trabajo realizado.

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

En la figura 18, se observa el proceso de socialización del protocolo de producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*, realizado al directorio y personal que labora en la AACRI, con el fin de mostrar los resultados logrados, y dar las pautas para el buen uso del protocolo realizado.

En el proceso de socialización se dio a conocer las normas de bioseguridad que deben seguir para el correcto manejo y producción de los hongos, además se expuso en torno a las pautas para una permanente capacitación y control de salud del personal encargado del laboratorio.

CONCLUSIONES

En la fase de diagnóstico las adecuaciones, la adquisición de nuevos equipos y materiales ayudaron a mejorar la producción y conservación de los hongos en estudio, además la observación de los procesos de producción con los que trabajaba la AACRI ayudó a conocer donde existían falencias; así con la implementación del protocolo se corrigieron o adicionaron nuevos procesos en pos de una mejor producción.

El bioensayo realizado para la activación de la virulencia de *Beauveria bassiana*, evidenció la esporulación de este hongo entomopatógeno sobre brocas del café, lo que conlleva a concluir que este hongo cumple con su papel de un biocontrolador de plagas, siendo una cepa idónea para su producción.

La prueba de antagonismo por disco dual realizada entre *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum*, demostró que la cepa del hongo antagonista presenta, según la escala de Bell, el nivel adecuado para cumplir su rol como inhibidor del crecimiento de fitopatógenos, siendo una cepa idónea para la producción a mayor escala.

En la fase de producción, el mejor sustrato para la producción de *Beauveria bassiana* fue T0 (Arroz 100%), con una concentración de $1,43 \times 10^8$ esporas por gramo de sustrato, mientras que para *Trichoderma harzianum* el mejor tratamiento fue T3 (Arroz 80% y bagazo 20%) con una concentración de $2,41 \times 10^8$ esporas por gramo de sustrato. Estos valores permiten considerar que la concentración de esporas de cada hongo está dentro de los parámetros requeridos para la comercialización dentro de un producto formulado.

En la fase de conservación de los dos métodos analizados aceite mineral y sílica gel, el que presentó esporulación sin contaminación y una adecuada reactivación de las dos cepas, fue el método de sílica gel. Lo que conllevó a ser el método escogido para la conservación de las cepas en estudio.

El protocolo, fue realizado en un formato estructurado de manera básica y legible para el público en general, donde se presentó técnicas, procedimientos y recomendaciones para una correcta ejecución en la producción de los hongos.

En la fase de socialización del trabajo realizado, la exposición favoreció la comprensión por parte de los socios de la AACRI del aporte que brindará a su asociación la implementación del actual protocolo.

Se acepta la hipótesis alternativa, ya que el diseño e implementación de un protocolo de producción y conservación de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* aportó favorablemente en la producción de café orgánico de la AACRI.

La implementación de un protocolo y un seguimiento de procesos garantizan la calidad e inocuidad del producto final, lo que brinda confianza para poder utilizar correctamente los productos.

RECOMENDACIONES

Realizar mantenimiento de aparatos y equipos, cada seis meses para mantener el buen estado y funcionalidad de todos los equipos.

Capacitar continuamente al personal y mejorar la infraestructura del laboratorio con normas de bioseguridad vigentes con el fin de precautelar la salud de todos los involucrados en la producción de microorganismos.

Optimizar el espacio sub utilizado dentro del laboratorio y darle un uso adecuado a los mismos.

Comprobar la virulencia de las cepas cada seis repiques para medir su efectividad.

Evaluar la efectividad de las formulaciones de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* en campo sobre el cultivo de café, con el fin de corroborar su efecto como controladores biológicos.

Realizar un control de calidad cada tres meses de las cepas conservadas en silica gel de los dos hongos para comprobar su viabilidad y virulencia.

Tomar en cuenta los parámetros de aplicación (temperatura, pH, calidad del agua, CE) en la preparación del producto antes de ser aplicado directamente sobre el cultivo de café.

Revisar los equipos y las boquillas antes de la aplicación para evitar taponamientos y pérdida del producto.

GLOSARIO

- **Ácido oxálico (toxina):** Este compuesto ha sido descrito como un factor de virulencia en hongos fitopatógenos y se ha sugerido que en el caso de los hongos entomopatógenos puede ser un elemento que coadyuve a la solubilización de la proteína cuticular
- **Alameticina:** Un grupo de undecapéptidos cíclicos estrechamente relacionados del hongo *Trichoderma polysporum* y *Cylindocarpon lucidum* . Ellos tienen alguna acción antineoplásica y antifúngica e importantes efectos inmunosupresores.
- **Basianólido:** mostró una fuerte acción insecticida tanto por ingestión como por inyección contra larvas de gusanos.
- **Beauvericina:** toxina bioactiva de naturaleza peptídica, a la que se le atribuyen propiedades insecticidas y antimicrobiales, causando en el huésped la degeneración progresiva de tejidos, cambios estructurales de las membranas y deshidratación. Además provoca un cambio en la actividad eléctrica por el incremento de consumo de oxígeno en un intento del insecto por restablecerse.
- **Beauverolidos:** estos compuestos tienen una fuerte acción inmunomoduladora pero no un efecto insecticida.
- **Citocalasina:** La citocalasina D es un metabolito de origen fúngico capaz, como todas las citocalasinas, de unirse a filamentos de actina y, por ello, impedir su polimerización y elongación. Por ello, repercuten en la morfología celular e inhiben procesos celulares como la división celular, lo que deviene en algunos casos a su apoptosis. Además, la citocalasina D inhibe la síntesis de proteínas
- **Conidia:** es una espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena.
- **Cutinasas:** son enzimas que catalizan la hidrólisis del polímero lipídico cutina, un componente estructural de la cutícula de las plantas. Estas enzimas muestran propiedades catalíticas de esterasas y lipasas, debido a que pueden hidrolizar ésteres solubles y triacilglicerol, además de las reacciones inversas de síntesis en medios con baja actividad de agua.
- **Destruixinas:** Las destruxinas son los compuestos mejor caracterizados, ya que su modo de acción también inhibe la síntesis de ADN, ARN y de proteínas en las

células de los insectos. Además, las destruxinas son capaces de inhibir la secreción de fluidos por el tubo de Malpighi en *Schistocerca gregaria*.

- **Élitros:** Los élitros son las alas anteriores, modificadas por endurecimiento (esclerotización), de ciertos órdenes de insectos como los coleópteros y los heterópteros.
- **Epicutícula:** capa externa que recubre a los artrópodos.
- **Esporodoquios:** tipo de estructura reproductiva asexual de hongos imperfectos. Los esporodoquios aparecen sobre la superficie del micelio del hongo, que toma morfología almohadillada en la zona donde aparecen estas estructuras, como una masa apretada de conidióforos cortos, simples o ramificados, formando un grupo compacto a partir de las hifas subyacentes.
- **Pronoto:** Placa dorsal del primer segmento del tórax (protórax) en los insectos.
- **Parasitoides:** Un parasitoide es un insecto cuyas larvas se alimentan y desarrollan en el interior (endoparásitos) o en la superficie (ectoparásitos) del cuerpo de otro artrópodo.
- **Epicutícula:** capa externa que recubre a los artrópodos.
- **Hemocele:** Cavidad general secundaria de los artrópodos, que constituye un sistema lagunar lleno de líquido hemático y forma parte del aparato circulatorio abierto.
- **Integumento:** es con frecuencia el sistema orgánico más extenso de un animal ya que lo recubre por completo, tanto externamente, como numerosas cavidades internas. Su función es la de separar, proteger e informar al animal del medio que le rodea; en ocasiones actúa también como exoesqueleto.
- **Lectina:** Las lectinas son proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto. No se deben confundir con las glicoproteínas: las lectinas reconocen carbohidratos, mientras que las glicoproteínas están formadas en parte por ellos. Su principal papel está en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular. Por ejemplo, algunas bacterias utilizan lectinas para acoplarse a las células del organismo hospedador durante la infección.
- **Plasmatocitos:** pertenecen al sistema inmunitario y su papel consiste en la secreción de grandes cantidades de anticuerpos.

- **Propágulos:** parte o estructura de un organismo (planta, hongo o bacteria), producido sexual o asexualmente, capaz de desarrollarse de manera separada para dar lugar a un nuevo organismo idéntico al que le formó. Es decir, es cualquier estructura de reproducción y propagación biológica.
- **Quitinasas:** enzimas hidrolíticas que rompen enlaces glicosídicos en moléculas de quitina. Las quitinasas son generalmente encontradas en organismos ya sea que necesiten remodelar su propia quitina o disolver y digerir la quitina de hongos o animales.
- **Trichoteceno:** Los tricotecenos son una familia de micotoxinas producidas por varias especies de hongos. Los tricotecenos son sesquiterpenos con un peso molecular entre 250 y 550 dalton; reciben su nombre por poseer el esqueleto tetracíclico,12,13-epoxitricotec-9-eno. Pueden contar con grupos hidroxilos o acetilos en ciertas posiciones en el núcleo de la molécula y cadenas laterales de estructura variada.

LISTA DE REFERENCIAS

- Aceves, M. (2008). *Producción masiva de Trichoderma harzianum en diferentes sustratos*.
- Ada Alvarado, & Miguel Monroig. (2007). *Guía práctica de Enfermedades y Plagas en café*. Obtenido de <http://academic.uprm.edu/aalvarado/HTMLobj-117/cafe.pdf>
- Alarcón , D. (22 de Agosto de 2006). *Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana*. Bogotá, Colombia.
- Alulima, M. (2012). *Alternativas agroecológicas para el manejo del café*. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3251/1/TESIS.pdf>
- Arias, P., Banda, B., Bejarano, R., Benites, D., & Arellano, J. (2014). *Efecto de Beauveria bassiana sobre la mosca Anastrepha sp. y larvas del cogollero Spodoptera frugiperda en condiciones de laboratorio*. Rebiolest, 27.
- Aristizábal, L., Salazar , H., & Mejía , C. (Enero de 2002). *Investigación participativa con agricultores en el manejo integrado de la broca de café en Colombia*. Obtenido de http://www.kohalacenter.org/cbbworkshop/pdf/PAPER_FinalReportICO_CFC_CABIBioscienceCBB2002.pdf
- Báez, F. (Octubre de 2013). *Conteo de esporas*. (A. Quelal, Entrevistador)
- BSC. (2014). *bscecuador.com*. Recuperado el Octubre de 2014, de <http://www.bcsecuador.com/normativa>
- Bustillo , A., & Marín, P. (2002). *¿Cómo reactivar la virulencia de Beauveria bassiana para el control de la broca del café?* CATIE, 1-4.
- Cabello, T. (2007). *Entomopatógenos y sus características*. Obtenido de <http://www.ual.es/personal/tcabello/Temarios/CBTema06Web.pdf>
- Cadeño, V., & Ames, T. (Octubre de 2004). *Manual de laboratorio de hongos entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa.

- Cazares, L. (Enero de 2010). *Producción y Comercialización Asociativa de leche en la Zona de Intag- Imbabura*. Tesis previa a la obtención del título de Magister en desarrollo local. Quito, Pichincha, Ecuador: UPS.
- CET. (Septiembre de 2004). *Manual de producción y utilización de Trichoderma harzianum*. Santiago de Chile, Chile.
- Cholango, L. (Mayo de 2009). Tesis elaborada previa a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario. *Selección de cepas de Trichoderma sp. in vitro, para el control de problemas radiculares en flores de verano*. Quito, Pichincha, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.
- Cofenac. (2013). bscecuador.com. Obtenido de <http://www.bcsecuador.com/servicios/80-servicios/120-certificaci%C3%B3n-org%C3%A1nica>
- Constantino, L., Navarro, L., Berrio, A., Acevedo, F., Rubio, D., & Benavides, P. (Diciembre de 2011). Scielo.org.co. Recuperado el Octubre de 2014, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882011000200002
- Coronel, M. (Octubre de 2010). Proyecto final de Máster para la obtención del Título de Máster Internacional en Nutrición y Dietética. *Estudio del Café Especial Ecuatoriano*. Quito, Pichincha, Ecuador: FUNIBER (Fundación Universitaria Iberoamericana).
- Cruz, L. (Junio de 2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii a escala piloto*. Bogotá, Colombia. Recuperado el Octubre de 2014, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>
- Diario La Hora. (10 de Enero de 2008). *Café de Intag busca un Nuevo Mercado*. Diario La Hora, pág. 1.
- E-Centro. (2012). Centrodeartigos.com. Recuperado el 2014, de http://centrodeartigo.com/articulos-informativos/article_61558.html
- Echeverría, F. (Enero de 2006). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin*. Cartago.

- Estrella, B., & Sánchez, M. (2006). Disertación de grado previa a la obtención del título de licenciado en Microbiología Clínica y Aplicada. *Evaluación de sustratos para la producción artesanal de un bioinsecticida a base del hongo entomopatógeno Metarhizium anisopliae utilizado en el control biológico de picudos (Rhynchophorus palmarum) en cultivos de palmito (Bactris gasipaes)*. Quito, Pichincha, Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- FAO. (24 de Octubre de 2014). fao.org. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/field/003/AC410S/AC410S03.htm>
- Fernández, O. (S,A). Laboratorio de Hongos Entomopatógenos INISAV Ciudad de la Habana Cuba. Recuperado el 27 de Agosto de 2014, de *Tecnologías para la produccion de biopesticidas a base de hongos entomopatogenos y su control de la calidad.:* <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/HONG-ENT.htm>
- Fuertes, R. (2013). *Auditoria Financiera Externa a los Estados Financieros y Movimiento Económico de AACRI por el período comprendido entre 2008 - 2013*. Apuela, Imbabura, Ecuador.
- Galán, L.,Gandarilla, L., Arévalo, K., Elías, M., & Quintero, I. (2013). *Evaluación de aislados nativos mexicanos de Beauveria bassiana*. Agrociencia, 255-266.
- Gato, Y. (2010). *Métodos de conservación y formulación de Trichoderma harzianum rifai*. Fitosanidad, 189-195.
- González, M., Valencia, A., & Bustillo, A. (2001). *Incremento de la patogenicidad de Beauveria bassiana sobre Hypothenemus hampei, utilizando integumento del insecto en el medio de cultivo*. Manejo Integrado de Plagas, 31-35.
- Grabowski, C., Orrego, A., & Stauffer, A. (2005). *Eficiencia de sustratos sobre la esporulación de hongos entomopatógenos Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae y Paecilomyces sp*. Investigación Agraria.
- Granda, D. (2006). *Producción y uso de hongos entomopatógenos*. CATIE, 1-63. Obtenido de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0949E/A0949E.PDF>
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L., & Olivar, R. (Junio de 2009). *Control Biológico una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible*.

Recuperado el Octubre de 2014, de
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/29752/1/articulo5.pdf>

Hernández, V., & Berlanga, A. (1999). *Uso de Beauveria bassiana como insecticida microbial*. Bogotá: Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

Hoyos, L., Duque, G., & Orduz, S. (2008). *Antagonismo in vitro de Trichoderma spp. sobre aislamientos de Sclerotinia spp. y Rhizoctonia spp.* Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas Vol2 , 76-86.

Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2008). *Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos*. Revista de Protección Vegetal Vol.24, 14-21.

Jacas, J., Caballero, P., & Avilla, J. (2005). *El control biológico de plagas y enfermedades*. Catelón de la Plana: Universitat Jaume.

Kouassi, M. (2001). *Les possibilités de la lutte microbiologique emphase sur le champignon entomopathogene B. bassiana*. Obtenido de
http://www.vertigo.uqam.ca/.../mathias_de_kouassi.html

Lara, M. (2010). Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Recuperado el Octubre de 2014, de
<http://repositorio.ucsg.edu.ec:8080/bitstream/123456789/995/1/T-UCSG-PRE-TEC-AGRO-19.pdf>.

Lecuona, R. (2007). *Situación actual y perspectivas del uso de bioplaguicidas en latinoamérica*. Obtenido de <http://www.biocotarica.com>

Matínez , L. (2010). *Desarrollo de un protocolo de formulación con hongos entomopatógenos para el manejo de Demotispa neivai Bondar*. Bogotá.

Monzón, A. (2001). *Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua*. CATIE, 95-103.

Monzón, A. (2004). *Control biológico de la broca (Hypothenemus hampei) en el cultivo de cafe*. Obtenido de
[https://www.google.com.ec/#q=Monz%C3%B3n%2C+A.+2004.+Control+biol%C3%B3gico+de+la+broca+\(Hypothenemus+hampei\)+en+el+cultivo+de+caf%C3%A9.+Universidad+Nacional+Agraria+\(UNA\).+Direcci%C3%B3n+d](https://www.google.com.ec/#q=Monz%C3%B3n%2C+A.+2004.+Control+biol%C3%B3gico+de+la+broca+(Hypothenemus+hampei)+en+el+cultivo+de+caf%C3%A9.+Universidad+Nacional+Agraria+(UNA).+Direcci%C3%B3n+d)

e+Investigaci%C3%B3n%2C+Extensi%C3%B3n+y+Postgrado+(DIEP).+Serie+T

Nicholls, C. (2008). *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Medellín: Universidad de Antioquia.

Ortiz, S. (2009). *Producción artesanal de un bioinsecticida a base del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana*. Quito.

Ospina, H. (2002). *Proyecto manejo integrado de la broca del café*. Cali, Colombia: Feriva S. A.

Quinchiguango, E. (2008). Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario. *Evaluación de la eficiencia de Trichoderma harzianum en el control de Fusarium sp en dos variedades de lisianthus (Balboa purple y Catalina white) aplicando tres dosis a dos frecuencias diferentes*. Cayambe, Pichincha, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.

Rey, M., Delgado, J., Rincón, A., Limón, M., & Benítez, T. (2000). *Mejora de cepas de Trichoderma para su empleo como biofungicidas*. Revista Iberoamericana de Micología, 31-36.

Santamarina, G. (2007). *MIP - control cultural*. Obtenido de http://ing.santamarina.tripod.com/sitebuildercontent/sitebuilderfiles/controlcultural_no.2.pdf

Stanley, N. (28 de Noviembre de 2014). ehowenespanol.com. Obtenido de http://www.ehowenespanol.com/definicion-del-protocolo-laboratorio-sobre_98264/

Tequendamia. (Julio de 2014). Wikipedia. Recuperado el Octubre de 2014, de <http://es.wikipedia.org/wiki/Coffea>

Torres, E., Córdova, S., Fieweger, M., Álvarez, M., Merizalde, M., & Chapi, J. (2007). *Mujeres Líderes en el desarrollo de la Zona de Intag Cantón Cotacachi*. España: Diputación.

Universidad de Cantabria. (2010). *El ABC del Comercio Justo*. Recuperado el Mayo de 2013, de http://www.unican.es/NR/rdonlyres/F49FC0E4-42E2-4505-9048-E58B3FB3373E/56278/El_ABC_del_CJ_3_medioambiente.pdf

- Urtubia, I., & France, A. (2007). *Formulaciones de hongos entomopatogenos para control de plagas en agricultura*. Plagas y enfermedades, 46-48.
- Valiño, E., Elías, A., Carrasco, T., & Nereida, A. (2003). *Efecto de inoculación de la cepa Trichoderma viride 137 en el bagazo de caña de azúcar autofermentado*. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 43-49.
- Vazquez, A. (Diciembre de 2011). *El cafe: nuevas aplicaciones en 15 recetas de sal y dulce*. Monografía previa a la obtención del título de: “Licenciada en Gastronomía y Servicios de alimentos y Bebidas” . Cuenca, Azuay, Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Villafuerte, O. (Junio de 2008). Agroancash. Recuperado el Octubre de 2014, de <http://www.agroancash.gob.pe/public/articulos/aip2008/temas/enfermedades.htm>
- Villegas, M. (2012). Ingeniate.com. Recuperado el 29 de Agosto de 2014, de Trichoderma pers. *Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible*: <http://www.oriusbiotecnologia.com/trichoderma-pers-caracteristicas-generales-y-su-potencial-biologico-en-la-agricultura-sostenible>

ANEXOS

Anexo 1. Ficha de Producción de microorganismos

Producción de <i>Beauveria bassiana</i>		
Fecha de inicio del proceso		
Fecha de finalización del proceso		
Responsable		
Materia Prima	Cantidad (g)	Producto final (270g/funda)
Arroz Rico	2000 g	5

Dosis: 270 g de producto por cada 20 L. Equivalente a la aspersión en 1 ha.

Producción de <i>Trichoderma harzianum</i>		
Fecha de inicio del proceso		
Fecha de finalización del proceso		
Responsable		
Materia Prima	Cantidad (g)	Producto final (270g/funda)
Arroz Rico	1800 g	5
Bagazo de caña	200 g	

Dosis: 270 g de producto por cada 20 L. Equivalente a la aspersión en 1 ha.

Anexo 2. Fotos de la recolección de la Broca del Café (*Hypothenemus hampei*).



Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 3. Fotos de la recolección de plantas de babaco infectadas con (*Fusarium oxysporum*)



Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 4. Proceso de producción de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* de la AACRI

a) Elaboración de Agar Papa Dextrosa (PDA)

- Pesar 19,5g de PDA comercial
- Agregar el PDA en 500ml de agua destilada
- Hervir sobre un hot-plate con agitación continua (agitador magnético)
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos y una atmósfera de presión.
- Dejar enfriar hasta 45°C
- Dispensar en 25 cajas petri.

b) Producción de biomasa de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*

- Seleccionar una caja de biomasa del hongo (*Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*).
- Tomar una asada del hongo y sembrar en la caja petri con PDA.
- Colocar las cajas en incubación a 27 °C (*Beauveria bassiana*) y 30 °C (*Trichoderma harzianum*), durante 7 días.

c) Preparación de sustrato

- Pesar de 1 a 3 kilos de arrocillo y colocar en una gaveta.
- Medir 150 ml de agua potable en un vaso de precipitación (150ml/kg)
- Dejar reposar el agua por 15 minutos y agregar 3 g de SMg (Sulfato de magnesio), más 2 g de Nitrofoska azul.
- Mezclar todos los componentes.
- Verter la solución en el sustrato y homogenizar.
- Colocar el sustrato en fundas de propietileno, pesando aproximadamente 120g con un vaso plástico.
- Sellar las fundas en la parte superior con ayuda de una grapadora.
- Colocar las fundas con el sustrato en la autoclave.
- Sacar las fundas y colocarlas en gavetas

d) Formación del inóculo

- Tomar una caja de biomasa y 180 ml de agua destilada en un Erlenmeyer
- Raspar el contenido de la caja en el agua y agitar por 2 horas en el agitador.

e) Inoculación del sustrato enfundado

- Colocar las fundas de forma ordenada dentro de la cámara de flujo
- Coger 10 ml del inóculo con una jeringuilla
- Depositar alícuotas de 2ml por cada funda
- Agitar vigorosamente para homogenizar
- Guardar las fundas en las mismas gavetas y llevar a incubación
- En el cuarto de incubación, destapar las gavetas y colocarlas separadamente a 27 °C durante 7 días

f) Empaque del sustrato esporulado

- Pesar 270 g del sustrato en fundas de polifan
- Sellar las fundas con cinta adhesiva “scotch”
- Llevar a refrigeración, separando un hongo de otro.

Fotos del Proceso de Producción de hongos AACRI
Preparación del inóculo
A B



Inoculación del sustrato con jeringa y aguja de 10 ml	
C 	D 
Agitación de las fundas con sustrato inoculado	Almacenado del sustrato en gavetas
E 	F 
Cuartos de incubación	Hongo esporulado sobre sustrato
G 	H 

Anexo 5. Medios de enriquecimientos de las cepas en estudio

Medio	Componentes	Cantidades
Medio 1- Caldo Nutritivo	• Extracto de carne • Peptona • ClNa • Agua destilada	3g 2g 5g 1000 ml
Medio 2- Agua Peptonada	• Peptona • ClNa • Agua destilada	1 g 8,5 g 1000 ml
Medio 3- Agua potable	• Iones como: cloruros, nitratos, nitritos, amonio, calcio, magnesio, fosfato, arsénico.	1000 ml
Medio 4- Agua Destilada	• Carece de iones fluoruro y sales minerales.	1000 ml

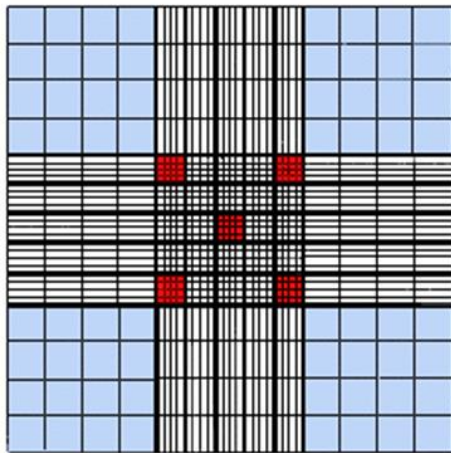
Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 6. Conteo de esporas en cámara de Neubeauer

- Tomar con el asa una pequeña cantidad del hongo y colocarlo en un tubo con 9ml de agua destilada.
- Realizar diluciones hasta 10^{-3}
- Llevar a agitación magnética la dilución por 1 minuto
- Cubrir la cámara de Neubauer con el cubreobjetos
- Con una micropipeta tomar 20 μl de suspensión y colocarlos en la cámara de Neubauer hasta que se llene la cámara por capilaridad
- Dejar reposar la muestra por 1 minuto para que las esporas decanten
- Observar al microscopio utilizando el lente objetivo (40x es un aumento adecuado)

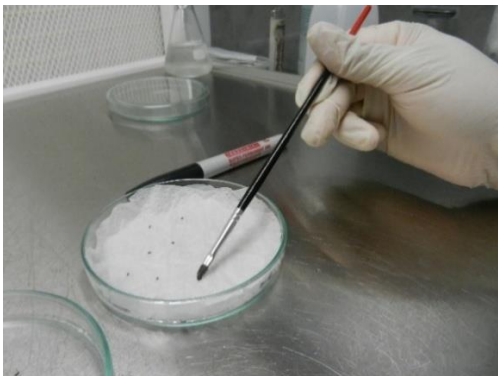
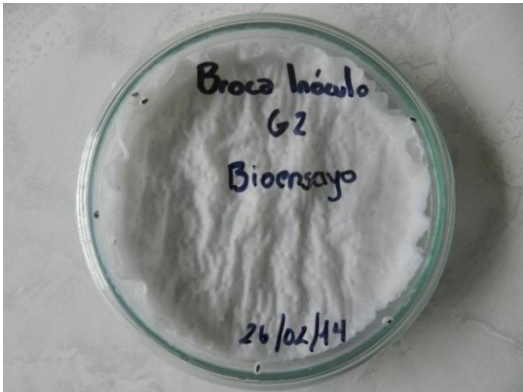
Contar los conidios presentes en los cuadrantes destinados para su lectura, empezando por el primero de la parte superior izquierda. También se deben contar los conidios que están ubicadas entre y tocando la primera y segunda de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadrante. (Báez, F., 2013)

Celdas para contar esporas- Cámara de Neubauer



Fuente: (Escamilla, 2012)

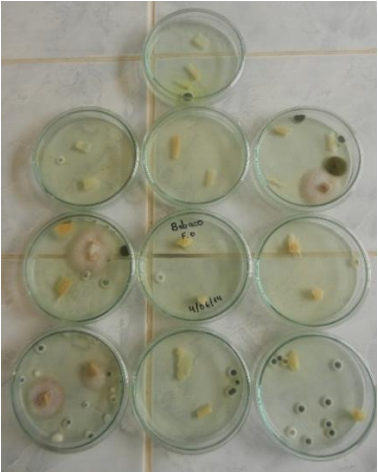
Anexo 7. Fotos de la reactivación de la virulencia de *Beauveria bassiana* (Bioensayo)

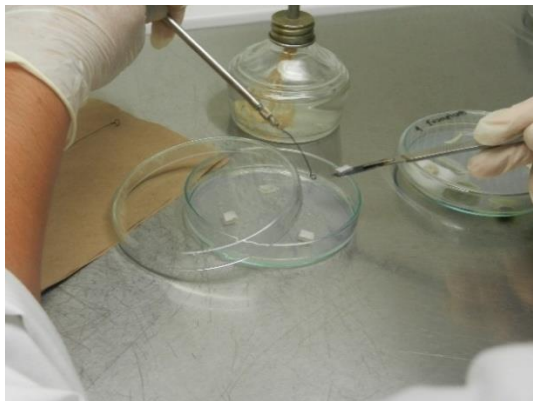
Extracción manual de las brocas de cada cereza del café	
A 	B 
Lavado de las brocas con agua destilada estéril	Secado de las brocas en papel toalla
C 	D 
Crecimiento en cámara húmeda	Colocación en PDA de broca esporulada
E 	F 

Nota: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 8. Aislamiento del hongo fitopatógeno (*Fusarium oxysporum*)

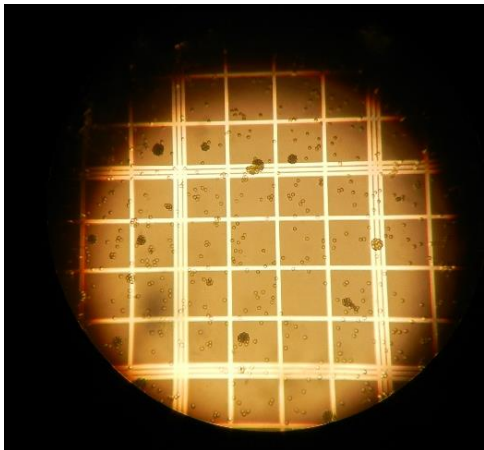
- Del cuello de la planta de babaco, se cortaron 20 trozos de 1cm² de tejido enfermo (que presenta síntomas típicos de la enfermedad), con el bisturí.
- Se desinfectaron en una caja petri, por inmersión en 10ml de NaCl al 2,5%, durante 3 minutos.
- Se enjuagaron con 500ml de agua destilada estéril contenidos en una pizeta.
- Se colocaron sobre papel absorbente estéril, durante 10 minutos para disminuir la humedad.
- Se tomaron con una pinza estéril y se colocaron en cajas petri con PDA.
- Las cajas petri, se incubaron por 7 días a 24°C.
- Se seleccionan las cajas que no presenten contaminación.
- Se aumenta la biomasa mediante siembra en cajas petri con PDA.

Desinfección de las muestras de babaco infectado	Secado de las muestras de babaco infectado
A 	B 
Esporulación de <i>Fusarium oxysporum</i>	
C 	D 

Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> (Método corte de agar)	
E 	F 
Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> (Método estriado)	Esporulación de <i>Fusarium oxysporum</i>
G 	H 

Nota: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 9. Fotos de la prueba de antagonismo de *Trichoderma harzianum* vs *Fusarium oxysporum*

Raspado de los hongos	
A 	B 
Conteo de esporas en cámara de Neubauer	
C 	D 
Inmersión de discos en el inóculo del hongo	

E

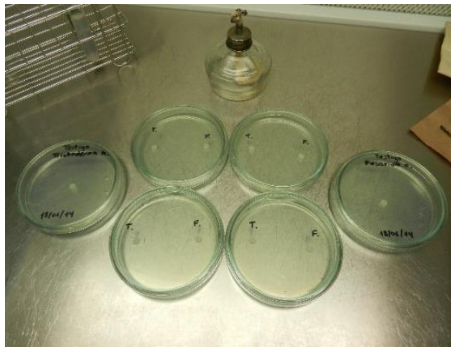


F



Esporulación de los hongos sometidos a la prueba de antagonismo por disco dual

G

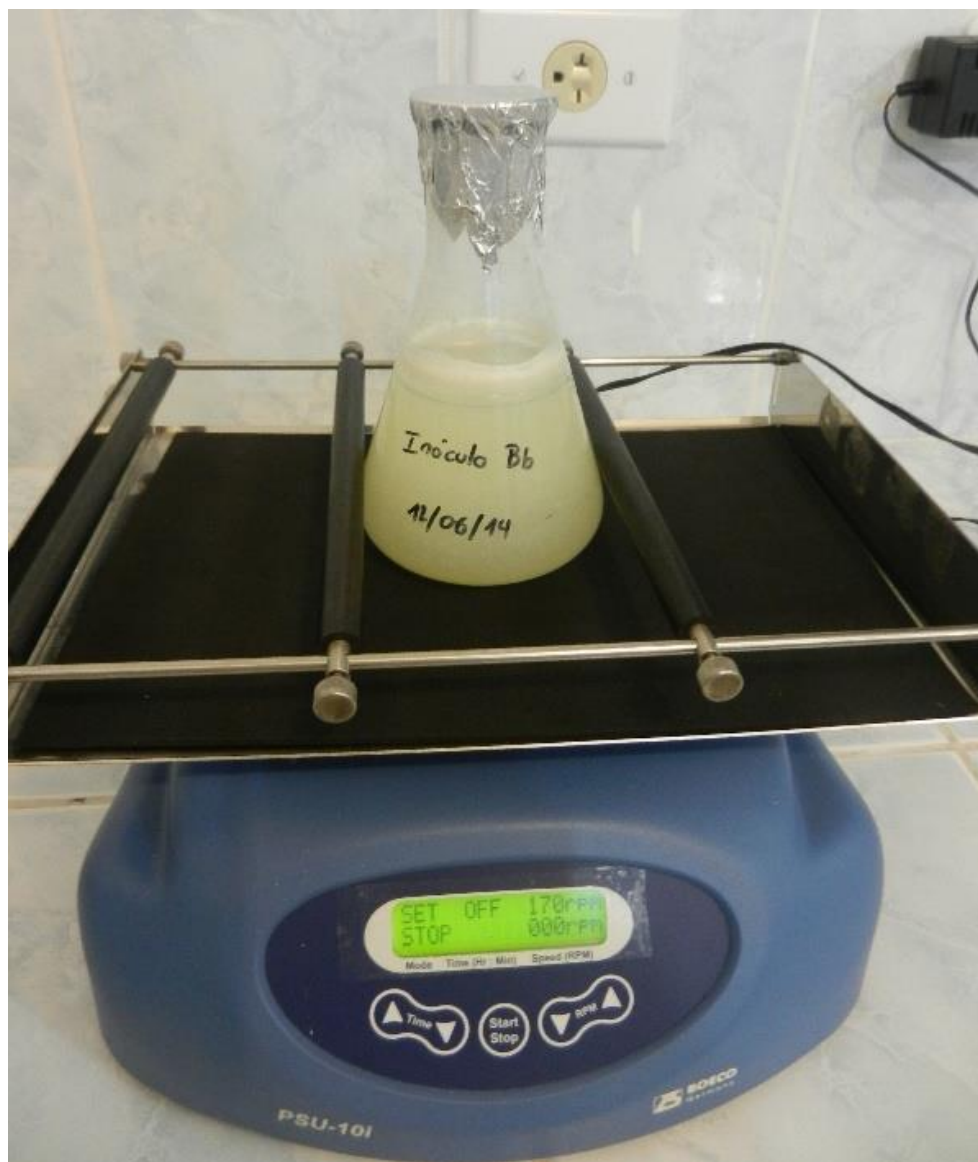


H



Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 10. Foto de la preparación del inóculo



Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 11. Enfundado y pesaje de tratamientos

Pesado del sustrato	
Sellamiento de cada sustrato	

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 12. Fotos de la inoculación e incubación de los tratamientos

Corte de la funda	Inyección del inóculo del hongo en el sustrato
	
Sellado del corte de la funda y agitación	Incubación de los sustratos inoculados
	

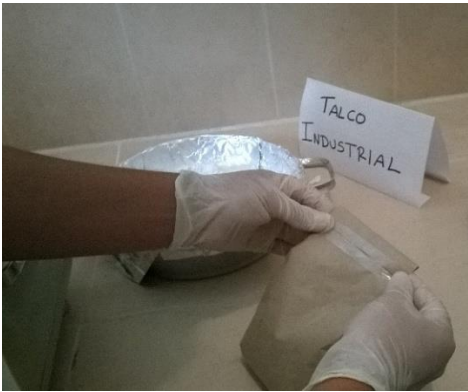
Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 13. Fotos del secado de los tratamientos



Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 14. Fotos de la formulación del producto

Molido de los sustratos	Formulación con talco industrial
A 	B 
Empaque preliminar en funda de papel estéril	
C 	D 

Empaque final	Sellado y rotulado de los empaques
E 	F 
Presentación final del producto	
G 	

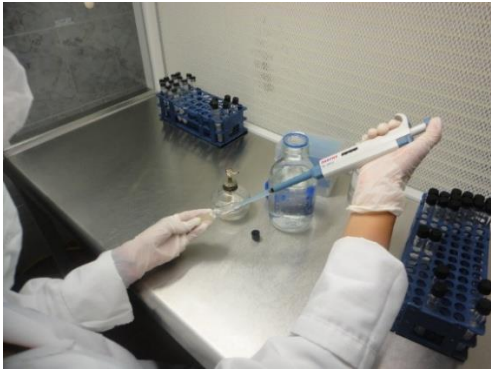
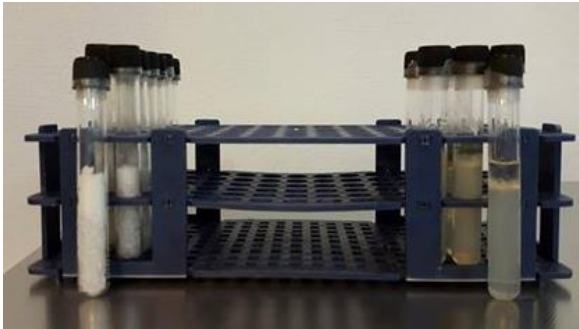
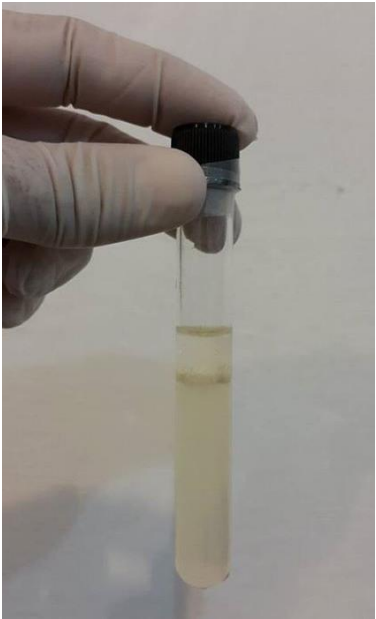
Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 15. Fotos de la conservación en sílica gel de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*

Colocación de sílica gel en los tubos de ensayo	
Esporulación del hongo sobre sílica gel	

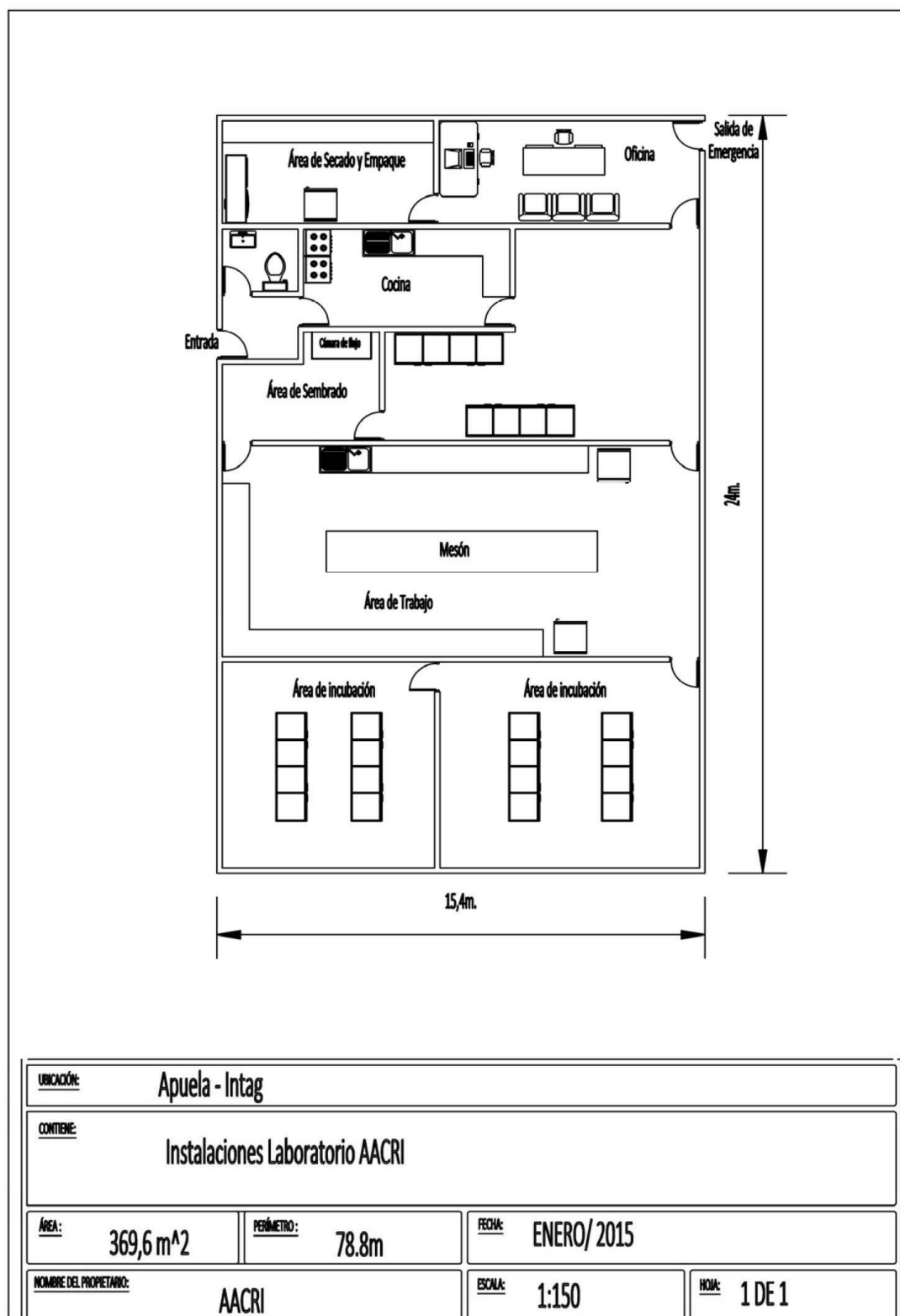
Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 16. Fotos de la conservación en aceite mineral de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*

Colocación de PDA en tubos de ensayo	Colocación del hongo y aceite mineral sobre el PDA
	
Hongo esporulado	
	

Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2014)

Anexo 17. Plano del laboratorio de la AACRI



Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2015)

Anexo 18. Normas de bioseguridad para un laboratorio nivel 2



3. LABORATORIOS BÁSICOS – NIVELES DE BIOSEGURIDAD 1 Y 2

11. Las puertas irán provistas de mirillas y estarán debidamente protegidas contra el fuego; de preferencia se cerrarán automáticamente.
12. En el nivel de bioseguridad 2 se dispondrá de una autoclave u otro medio de descontaminación debidamente próximo al laboratorio.
13. Los sistemas de seguridad deben comprender medios de protección contra incendios y emergencias eléctricas, así como duchas para casos de urgencia y medios para el lavado de los ojos.
14. Hay que prever locales o salas de primeros auxilios, convenientemente equipados y fácilmente accesibles (véase el anexo 1).
15. Cuando se planifique una nueva instalación, habrá que prever un sistema mecánico de ventilación que introduzca aire del exterior sin recirculación. Cuando no se disponga de ventilación mecánica, las ventanas deberán poder abrirse y, a ser posible, estarán provistas de mosquiteras.
16. Es indispensable contar con un suministro regular de agua de buena calidad. No debe haber ninguna conexión entre las conducciones de agua destinada al laboratorio y las del agua de bebida. El sistema de abastecimiento público de agua estará protegido contra el reflujo por un dispositivo adecuado.
17. Debe disponerse de un suministro de electricidad seguro y de suficiente capacidad, así como de un sistema de iluminación de emergencia que permita salir del laboratorio en condiciones de seguridad. Conviene contar con un grupo electrógeno de reserva para alimentar el equipo esencial (estufas, CSB, congeladores, entre otros), así como para la ventilación de las jaulas de los animales.
18. Es esencial un suministro fiable y adecuado de gas. La instalación debe ser objeto del debido mantenimiento.
19. Tanto los laboratorios como los locales destinados a los animales son a veces objeto de actos de vandalismo. Hay que prever sistemas de protección física y contra incendios. Cabe mejorar la seguridad reforzando las puertas, protegiendo las ventanas y limitando el número de llaves en circulación. Se podrán estudiar y aplicar otras medidas, según proceda, para incrementar la seguridad (véase el capítulo 9).

Material de laboratorio

Junto con los procedimientos y prácticas correctos, el uso de material de seguridad ayudará a reducir los riesgos cuando se trabaje con agentes biológicos que entrañen peligro. En la presente sección se exponen los principios fundamentales relacionados con el material apropiado para los laboratorios de todos los niveles de bioseguridad. Los requisitos en relación con el material de laboratorio correspondiente a niveles de bioseguridad más altos se detallan en los capítulos pertinentes.

Tras consultar con el funcionario de bioseguridad y el comité de seguridad (en caso de que se haya designado), el director del laboratorio debe velar por que el material sea apropiado y se utilice debidamente. Para elegir el material de laboratorio habrá que cerciorarse de que responda a los siguientes principios generales:

1. Que su diseño permita limitar o evitar los contactos entre el trabajador y el material infeccioso.
2. Que esté construido con materiales impermeables a los líquidos, resistentes a la corrosión y acordes con las normas de resistencia estructural.
3. Que carezca de rebabas, bordes cortantes y partes móviles sin proteger.
4. Que esté diseñado, construido e instalado con miras a simplificar su manejo y conservación, así como a facilitar la limpieza, la descontaminación y las pruebas de certificación; siempre que se pueda, se evitará el material de vidrio y otro material rompible.

Para cerciorarse de que el material posee las características de seguridad requeridas quizá sea necesario consultar sus especificaciones detalladas de funcionamiento y construcción (véanse también los capítulos 10 y 11).

Normas para la vigilancia de los trabajadores que manipulan microorganismos en el nivel de bioseguridad 2

1. El reconocimiento médico previo al empleo o a la asignación de un puesto es indispensable. Debe registrarse el historial médico de la persona y realizar una evaluación de la salud ocupacional para los fines del laboratorio.
2. El director del laboratorio debe mantener un registro de enfermedades y bajas laborales.
3. Las mujeres en edad fecunda deberán ser informadas de los riesgos que supone para el feto la exposición profesional a ciertos microorganismos, como el virus de la rubéola. Las medidas concretas que se adopten para proteger al feto dependerán de los microorganismos a los que pueda estar expuesta la mujer.

Procedimientos de manipulación y eliminación de material y desechos contaminados

Deberá adoptarse un sistema de identificación y separación del material infeccioso y sus recipientes. Se seguirán las normas nacionales e internacionales y se tendrán en cuenta las siguientes categorías:

1. Desechos no contaminados (no infecciosos) que puedan reutilizarse o reciclarse o eliminarse como si fueran «basura» en general.
2. Objetos cortantes y punzantes contaminados (infecciosos): agujas hipodérmicas, bisturís, cuchillas, vidrio roto; se recogerán siempre en recipientes a prueba de perforación dotados de tapaderas y serán tratados como material infeccioso.
3. Material contaminado destinado al tratamiento en autoclave que después pueda lavarse y volverse a utilizar o reciclarse.
4. Material contaminado destinado al tratamiento en autoclave y a la eliminación.
5. Material contaminado destinado a la incineración directa.

Objetos cortantes y punzantes

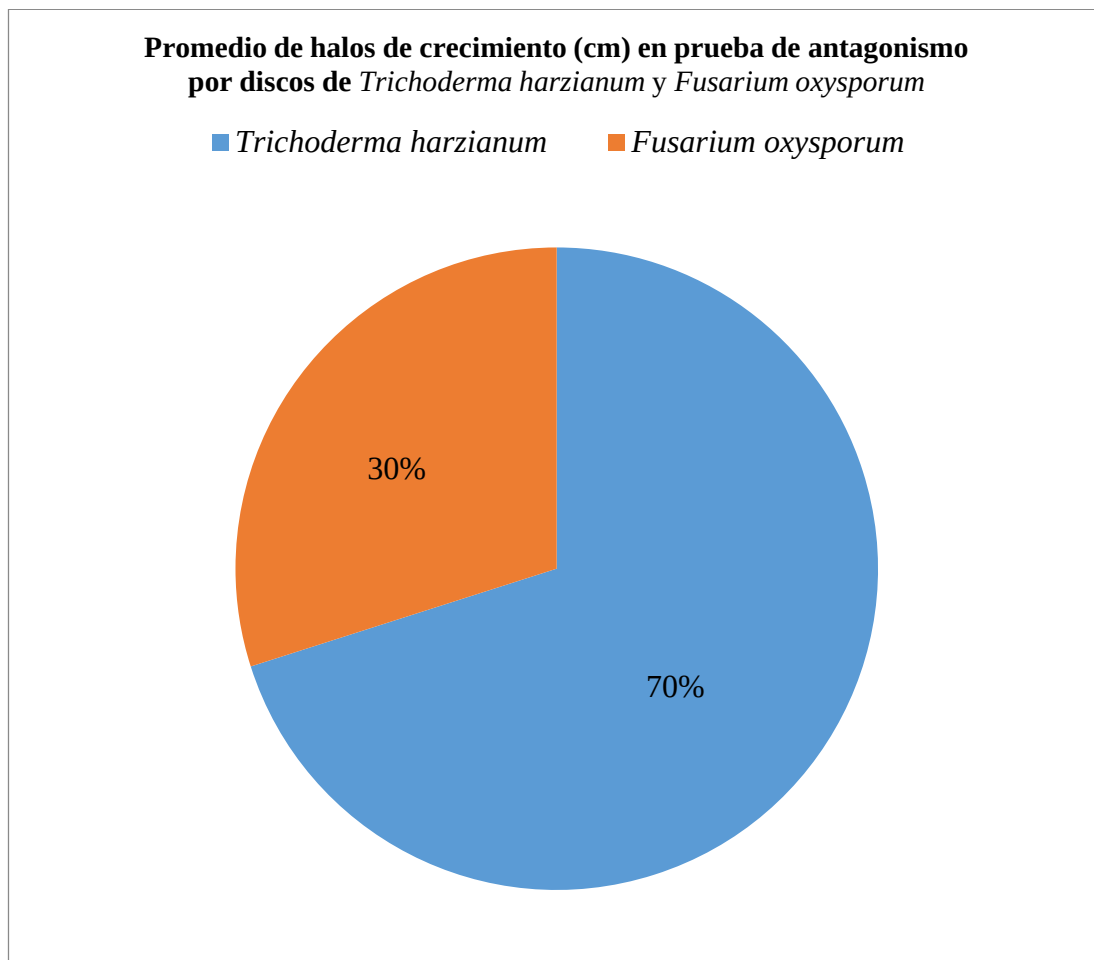
Las agujas hipodérmicas no se deben volver a tapar, cortar ni retirar de las jeringuillas desechables después de utilizarlas. El conjunto completo debe colocarse en un recipiente de eliminación específico. Las jeringuillas desechables, utilizadas con o sin aguja, se introducirán en recipientes de eliminación apropiados y se incinerarán, esterilizándolas previamente en autoclave si fuera necesario.

Los recipientes de eliminación de objetos cortantes y punzantes serán resistentes a la perforación y no se llenarán por completo. Cuando estén llenos en sus tres cuartas partes se colocarán en un recipiente de «desechos infecciosos» y se incinerarán, esterilizándolos primero en autoclave si la práctica del laboratorio lo exige. Los recipientes de eliminación de objetos cortantes y punzantes no se desecharán en vertederos.

Material contaminado (potencialmente infeccioso) para ser tratado en autoclave y reutilizado

No se efectuará limpieza alguna de ningún material contaminado (potencialmente infeccioso) que vaya a ser tratado en autoclave y reutilizado. Cualquier limpieza o reparación que se revele necesaria se realizará siempre después del paso por la autoclave o la desinfección.

Anexo 19. Porcentaje del promedio de los halos de crecimiento en el diámetro polar y ecuatorial de *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum* medidos en centímetros durante 7 días



Elaborado por: (Noboa & Quelal, 2015)