

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

**EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS DESTINADOS A LA PROPAGACIÓN
DE *Trichoderma harzianum* COMO BIOCONTROLADOR PARA FINCAS
AGROECOLÓGICAS DE LA ASOCAMCAY, AL NORTE DE LA PROVINCIA DE
PICHINCHA - ECUADOR**

AUTORAS

ARACELY JAZMÍN CUMBAGIN TORRES

CYNTHIA ALEJANDRA FLORES MORALES

DIRECTOR

JANSS BELTRÁN GALLARDO

Quito, diciembre del 2020

Cesión de derechos de autor

Nosotras, Aracely Jazmín Cumbagin Torres con documento de identificación N° 1724231004 y Cynthia Alejandra Flores Morales con documento de identificación N° 1722586524, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado: "EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS DESTINADOS A LA PROPAGACIÓN DE *Trichoderma harzianum* COMO BIOCONTROLADOR PARA FINCAS AGROECOLÓGICAS DE LA ASOCAMCAY, AL NORTE DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA - ECUADOR", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 1 de diciembre del 2020

.....


Aracely Jazmín Cumbagin Torres

CI 1724231004

.....

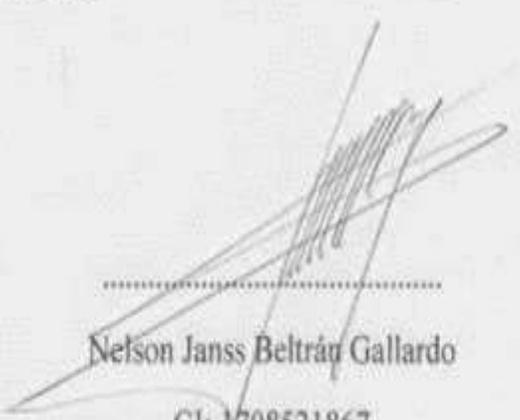

Cynthia Alejandra Flores Morales

CI 1722586524

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, Nelson Janss Beltrán Gallardo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, "EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS DESTINADOS A LA PROPAGACIÓN DE *Trichoderma harzianum* COMO BIOCONTROLADOR PARA FINCAS AGROECOLÓGICAS DE LA ASOCAMCAY, AL NORTE DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA - ECUADOR", realizado por Aracely Jazmín Cumbagin Torres con documento de identificación N° 1724231004 y Cynthia Alejandra Flores Morales con documento de identificación N° 1722586524; obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, 01 de Diciembre del 2020



.....

Nelson Janss Beltrán Gallardo

CI: 1708521867

Dedicatoria

A Dios dedico este trabajo pues sin sus bendiciones yo no podría estar en donde estoy; a él por brindarme la mejor familia del mundo que me enseñó que juntos somos más fuertes; a él por darme la dicha de ser madre del niño más inteligente y cariñoso del mundo, mi Samuel; a él por permitirme tener los mejores papitos, Luis y Vero, que son capaces de dar todo por sus hijas y nieto; a él por regalarme a mis flacas, Andreita y Mile, porque no pudiera vivir sin ellas; a él por dejarme compartir la vida con el hombre más amoroso, chistoso y mejor padre que un niño pueda tener, mi Xavier. Por último, quiero dedicar este trabajo a mi abuelito Gabino (+) porque sé que desde el cielo nos cuida y estaría orgulloso de lo que he conseguido.

Ale

A Dios por ser mi guía en todo este camino, por darme la fortaleza para no dejarme vencer por los obstáculos, por sus bendiciones y por su amor infinito.

A mis padres Jorge y Jessica que, con su apoyo y amor incondicional, sus consejos, su esfuerzo y sacrificio han hecho de mí una persona de bien, a ellos les dedico este gran logro, que lo que empezó como un sueño, ahora es una realidad, ser una gran profesional.

A mi hermano Xavier por siempre ser mi apoyo y un gran ejemplo a seguir, por enseñarme que por más obstáculos que te ponga la vida hay que aprender a ser fuerte y a levantarte después de cada caída.

Aracely

Agradecimiento

De todo corazón, mi más sincero agradecimiento a mis padres por permitirme formarme como una profesional, no me alcanzaría la vida para devolverles todo lo que me han dado. A mi Sami, a mis ñañas y a mi esposo Xavier por darme ánimo siempre que me veía estresada. Gracias a ellos por todo su amor y paciencia.

Ale

Gracias a mis padres que hicieron hasta lo imposible para que logre cumplir con este sueño de ser una gran profesional, a mi hermano y mi familia por darme ese amor, apoyo incondicional y por siempre estar al pendiente de mí en cada pasito que daba a lo largo de este camino. A ustedes y a Dios gracias por tanto amor.

Aracely

Queremos agradecer conjuntamente a la Universidad Politécnica Salesiana por brindarnos una educación de calidad; a nuestra carrera pues nos mostró la infinidad de campos en los que podemos desarrollarnos; a nuestro profe y tutor Ing. Janss Beltrán por sus conocimientos y estar siempre atento a cualquier inquietud generada en este trabajo así como mostrarnos los lindos paisajes de Cayambe y por poder colaborar con la ASOCAMCAY; a nuestra profe Máster Laura Huachi por ayudarnos con una parte clave de este trabajo brindándonos su conocimiento; a la Ing. Elizabeth Yugsi por su gran apoyo en el trabajo de laboratorio así como su gran disposición y calidez; a la Sra. Marisol Andrango y su madre por prestarnos un pedacito de tierra.

Índice

Capítulo I	1
1. Introducción	1
Capítulo II	5
2. Marco Conceptual	5
2.1 Microorganismos en la agricultura.....	5
2.2 Hongos entomopatógenos.....	5
2.3 <i>Trichoderma</i> spp.	5
2.4 <i>Trichoderma harzianum</i>	7
2.4.1 Clasificación taxonómica.....	7
2.4.2 Morfología	8
2.4.3 Condiciones de crecimiento.....	10
2.4.4 Mecanismos de acción.....	10
2.4.4.1 Micoparasitismo.....	10
2.4.4.2 Competencia	11
2.4.4.3 Antibiosis	12
2.4.4.4 Actividad lítica.....	12
2.4.5 Beneficios	13
2.4.6 Importancia agrícola como agente de biocontrol.....	13
2.5 Sistemas de producción de <i>Trichoderma</i>	14

2.5.1	Fermentación en estado líquido	16
2.5.2	Fermentación en estado sólido	16
2.6	Sustratos.....	17
2.7	Desechos agroindustriales.....	18
2.7.1	Arroz (<i>Oriza sativa</i>)	19
2.7.1.1	Composición química.....	19
2.7.2	Maíz (<i>Zea mays</i>).....	19
2.7.2.1	Composición	20
2.7.3	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	21
2.7.3.1	Composición química.....	21
2.7.4	Fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	22
2.7.4.1	Composición química.....	22
2.7.5	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	23
2.7.5.1	Composición química.....	23
Capítulo III	24
3.	Materiales y métodos.....	24
3.1	Fase de laboratorio	24
3.1.1	Área de trabajo	24
3.1.2	Obtención de cepa y reactivación	24
3.1.3	Prueba microscópica y macroscópica de características fúngicas de <i>T. harzianum</i>	24

3.1.3.1	Características macroscópicas	24
3.1.3.2	Características microscópicas	25
3.1.4	Proceso experimental	27
3.1.4.1	Tratamientos	27
3.1.4.2	Unidad experimental	28
3.1.5	Diseño experimental.....	29
3.1.6	Variables	29
3.1.6.1	Conteo de conidias	29
3.1.6.2	Viabilidad de conidias	29
3.1.7	Inoculación.....	30
3.2	Fase de campo	30
3.2.1	Ubicación.....	30
3.2.2	Características ambientales de la zona	31
3.2.3	Proceso experimental	32
3.2.3.1	Tratamientos	32
3.2.3.2	Unidad Experimental y distribución de tratamientos	32
3.2.3.2.1	Semilla	33
3.2.3.3	Manejo específico del proceso experimental.....	35
3.2.3.3.1	Aplicación de <i>T. harzianum</i>	35
3.2.3.3.2	Riego.....	35

3.2.3.4	Diseño Experimental	35
3.2.3.5	Variables	35
3.2.3.5.1	Biomasa aérea	35
3.2.3.5.2	Biomasa de raíces	36
3.2.3.5.3	Altura de planta	36
3.2.3.5.4	Incidencia de enfermedades	36
3.2.3.5.5	Severidad de enfermedades	36
Capítulo IV	38
4.	Resultados y discusión.....	38
4.1	Fase de laboratorio	38
4.1.1	Conteo de conidias	38
4.1.2	Viabilidad de conidias	42
4.2	Fase campo.....	43
4.2.1	Biomasa de la parte aérea	43
4.2.2	Biomasa de raíces.....	44
4.2.3	Altura de planta	46
4.2.4	Incidencia de enfermedades	48
4.2.5	Severidad de enfermedades	49
5.	Conclusiones	51
6.	Recomendaciones.....	52
7.	Bibliografía	53

Índice de tablas

Tabla 1 Composición química de las brácteas de protección de la inflorescencia femenina del maíz.	20
Tabla 2 Composición química del ajo	21
Tabla 3 Descripción y denominación de los tratamientos	28
Tabla 4 Descripción y denominación de los tratamientos probados en la fase de campo.....	32
Tabla 5 Características importantes de la variedad de Fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) Canario del Chota INIAP 420.....	34
Tabla 6 Rangos definidos por la prueba de Tukey al 5 %	38
Tabla 7 Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para la viabilidad de conidias, en porcentaje por tratamientos ..	42
Tabla 8 Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para la variable Biomasa de parte aérea	44
Tabla 9 Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para la variable Biomasa de raíces	45
Tabla 10 Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para la variable Altura de planta.....	47
Tabla 11 Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para Incidencia de enfermedades	48
Tabla 12 Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para Severidad de las plantas enfermas	50

Índice de figuras

Figura 1. Fiálides y conidióforos en forma de pirámide.....	9
Figura 2. Colonias de <i>T. harzianum</i> de tres días de crecimiento en PDA.....	25
Figura 3. Colonias de <i>T. harzianum</i> de cinco días de crecimiento en PDA.....	25
Figura 4. Fiálides largas y conidióforos	26
Figura 5. Numerosas esporas globosas del hongo	27
Figura 6. Finca propiedad de Marisol Andrango, área que se utilizó para la investigación (cuadro rojo).	31
Figura 7. Ubicación de los tratamientos en DCA	33
Figura 8. Gráficos que ayudan a la evaluación del porcentaje de severidad de enfermedades de importancia	37
Figura 9. Cantidad de conidias por tratamiento y por cada conteo	40
Figura 10. Se observa una planta sin aplicación de <i>T. harzianum</i> (izq.), planta con aplicación de <i>T. harzianum</i> (der.).....	45

Resumen

El uso indiscriminado de plaguicidas químicos es la causa de biorresistencias de plagas, la contaminación atmosférica y la alteración a la salud humana. En base a esta situación, es pertinente aplicar métodos de tratamiento de patógenos con el menor impacto negativo posible, como lo es el control biológico. La finalidad de esta investigación fue evaluar cinco residuos orgánicos de las actividades agrícolas de la Asociación Agroecológica La Campesina de Cayambe, como sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*, conocido como agente biocontrolador, bioestimulante y biofortificante. Se evaluó ajo (catáfila externa), fréjol (vaina), maíz (brácteas protectoras de la mazorca), tomate (epicarpio) y arroz (grano entero). Se aplicó un diseño completamente aleatorio, con cinco repeticiones. Se cuantificó la cantidad y porcentaje de viabilidad de conidias de *T. harzianum*. Se concluyó que las brácteas del maíz y la catáfila de ajo fueron los mejores sustratos, tanto de la producción como para viabilidad de conidias con $3,2 \times 10^7$ ufc/mL y $2,49 \times 10^7$ ufc/mL y con el 87,81 % y 87,18 % respectivamente. Se realizó pruebas en campo mediante aplicaciones de dos concentraciones (1×10^8 y 1×10^{10} ufc/mL) en semillas de *Phaseolus vulgaris*; después de cuatro semanas se monitoreó altura de la planta, biomasa de la parte aérea y de raíces, e incidencia y severidad de enfermedades. Se determinó que las concentraciones usadas dieron buenos resultados con respecto a las variables propuestas, sin embargo, se da énfasis a la biomasa de raíz la cual fue considerablemente alta.

Palabras clave: agroecología, sustrato, *Trichoderma harzianum*, biocontrolador, producción.

Abstract

The indiscriminate use of chemical pesticides is the cause of pest bioresistance, air pollution and alteration of human health. Based on this situation, it is pertinent to apply methods of treatment of pathogens with the least possible negative impact, such as biological control. The purpose of this investigation was to evaluate five organic residues from the agricultural activities of the Agroecological Association La Campesina of Cayambe, as substrates for the production of conidia of *Trichoderma harzianum*, known as biocontrol agent, biostimulant and biofortifier. It was evaluated garlic (external cataphila), bean (pod), corn (protective bracts of the ear), tomato (epicarp) and rice (whole grain). A completely randomized design was applied, with five replicates. The amount and percentage of viability of conidia of *T. harzianum* was quantified. It was concluded that corn bracts and garlic cataphila were the best substrates, both for production and viability of conidia with $3,2 \times 10^7$ cfu/mL and $2,49 \times 10^7$ cfu/mL and with 87,81 % and 87,18 % respectively. It was carried out field tests through applications of two concentrations (1×10^8 and 1×10^{10} cfu/mL) in *Phaseolus vulgaris* seeds; after four weeks it was monitored plant height, biomass of aerial and root part, and incidence and severity of diseases. It was determined that the concentrations used gave good results with respect to the variables proposed, however, emphasis is given to the root biomass which was considerably high.

Keywords: agroecology, substrate, *Trichoderma harzianum*, biocontroller, production.

Capítulo I

1. Introducción

La agricultura a partir de sus inicios ha tenido efectos concernientes al medio ambiente, los que en términos generales han sido netamente de alteración. Sin embargo, la producción de alimentos es una necesidad que no se puede dejar de cumplirse. El crecimiento de la población humana, la cantidad de hambruna en el mundo que superará los 840 millones para el 2030 (9,8 % de la población) a lo cual se suma los efectos del COVID-19 que está empeorando las perspectivas generales de seguridad alimentaria y nutrición, obliga a pensar en nuevas estrategias de producción. Evaluaciones preliminares indican que la pandemia lograría aumentar la cantidad de personas desnutridas a nivel global de 83 a 132 millones (FAO, 2020).

A mediados del siglo pasado, en casi todo el mundo, comenzó la transformación del régimen agrícola tradicional que se sustentaba en el uso de recursos, hacia otro rumbo orientado en una base tecnológica innovadora que se respaldaba en el uso de fertilizantes sintéticos inorgánicos, plaguicidas, herbicidas y semillas híbridas, al cual se llamó “revolución verde”, el mismo que se basa en que el crecimiento agrícola es una situación inevitable e indispensable para la industrialización y crecimiento económico del mundo (Chilon, 2017).

Es cierto que estas innovaciones tecnológicas han permitido un aumento en la productividad de los cultivos, pero no es menos cierto también que se base en el uso de insumos costosos, que además con el paso de los años han mostrado sus impactos negativos, disminuyendo la calidad de los recursos productivos como el agua y suelo, afectando la biodiversidad y el bienestar de las personas (Sarandón & Flores, 2014).

Según reportes sobre la alimentación y la agricultura, la Organización de las Naciones Unidas señaló que en el año 2019 se aplicaron 412 millones de toneladas de plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas y bactericidas) (FAO, 2020). Los problemas fitosanitarios de los pesticidas, sobre todo por su efecto residual, han causado mucha controversia, como los organoclorados debido a su alto grado de liposolubilidad (Huerta & Martínez, 2018).

Hace un tiempo, la agricultura ha sido un ámbito de importancia en América Latina y el Caribe (ALC). El importante aumento de la producción agrícola en la región, ha tenido un impacto significativo en la economía nacional, y en muchos países ha fomentado la preservación de un balance financiero (Escobar, 2016).

Según FAO (2020), en el 2018 Ecuador usó 607 toneladas de agrotóxicos a un costo de 275 millones de dólares, convirtiéndose en el tercer país con mayor consumo de agrotóxicos en Sudamérica. Así mismo, estadísticas del INEC (2013), muestran que los productores en un 12 % de las hectáreas de cultivos permanentes y en 10 % de cultivos transitorios, usan pesticidas sin comprender su toxicidad y sin percatarse en el profundo daño que causan al medio ambiente y a los conglomerados humanos, así como en las provincias del norte del país, el 70,1 % de los productores usan los plaguicidas según su experiencia.

Según Campaña y otros (2011) en el Foro de los Recursos Hídricos en el Ecuador sostienen que las enfermedades en humanos han tenido un incremento gradual del índice de mortalidad por cánceres a partir de la década de los 50 del siglo pasado, siendo el cáncer de estómago el que presenta la tasa más alta de mortalidad por agrotóxicos en provincias de la sierra como Carchi, Cotopaxi y Chimborazo mientras que en la costa la más afectada es El Oro.

Ahora bien, es necesario el desarrollo de estrategias integrales que se centren en el medio ambiente y en la protección de los recursos naturales, sin impactar negativamente los rendimientos, por lo tanto, es imprescindible la práctica de una agricultura más sostenible, a la cual se la puede denominar ecológica o agroecología.

La agroecología moderna reúne un conjunto de técnicas e innovaciones, basadas en principios ecológicos y en una profunda comprensión de los suelos, de cómo asimilan los nutrientes las plantas, del eficiente manejo de plagas, del potencial genético de los cultivos y de los animales y de las interacciones biológicas y ecológicas (UVIGO, s.f.).

Con respecto al manejo de plagas en agroecología, se establecen principios científicos que permiten una gestión correcta de los sistemas agrarios en armonía con el medio ambiente como la introducción y/o conservación de enemigos naturales, manteniendo un equilibrio para el desarrollo del cultivo, más que con la finalidad de eliminarlos; procurando mantener una población fluctuante, dentro de los límites aceptables a la salud y mantenimiento del cultivo y sin que afecte a plantas y/o animales de los ecosistemas adyacentes (Diez, 2010).

El abuso de sustancias químicas para controlar plagas y enfermedades en plantas y su inevitable daño ambiental, ha llevado a las personas a utilizar opciones de tipo biológico, como es el caso de *Trichoderma*, conocido como un género de hongos que habitan normalmente en la rizósfera, y se caracteriza como un simbiote vegetal oportunista (Djonovic, y otros, 2007); (Hohmann, Jones, Hill, & Stewart, 2011).

La Asociación Agroecológica la Campesina de Cayambe (ASOCAMCAY), fue creada en el 2014 con un objetivo común, la organización local y el intercambio de productos agrícolas y pecuarios en estado natural, lo que les permitió beneficiar a sus familias, restablecer los recursos naturales y

el fortalecimiento del desarrollo integral de las comunidades, todo en un ambiente fraterno y solidario.

La ASOCAMCAY ha provocado un impulso de la agroecología en su zona, suministrando alimentos de calidad y sobre todo libre de agroquímicos; pero, en lo referente al dominio de plagas y enfermedades, aún existen inconvenientes, lo que sigue impactando en los parámetros de productividad. Es por eso que es necesario que se apliquen técnicas de control sostenibles como por ejemplo el etológico, el cultural, el mecánico, entre otros.

Con esta investigación se aspira contribuir al desarrollo de la ASOCAMCAY, y por ende al mantenimiento de la salud del ambiente y las personas, mediante la generación de herramientas biotecnológicas que faciliten el control orgánico de sus cultivos a nivel de enfermedades y patógenos, a partir de sus propios recursos, que para la presente propuesta lo constituyen los residuos orgánicos que se generan de la actividad que realizan.

En consecuencia, el propósito de este estudio de investigación es evaluar sustratos orgánicos destinados a la propagación del hongo *T. harzianum* como un biocontrolador a ser usado en las fincas de la Asociación Agroecológica la Campesina de Cayambe (ASOCAMCAY). Entre los objetivos específicos se encuentran: evaluar residuos orgánicos obtenidos de la actividad agrícola de las fincas de la ASOCAMCAY, como potenciales sustratos para la eficiente propagación del hongo *T. harzianum*; así como el establecer pruebas en campo mediante la aplicación del hongo obtenido del mejor residuo orgánico, en *Phaseolus vulgaris*, comprobando su influencia en la altura de la planta, en la biomasa aérea y de raíces, así como la incidencia y severidad de enfermedades.

Capítulo II

2. Marco Conceptual

2.1 Microorganismos en la agricultura

El requerimiento de satisfacer la alta demanda de alimentos hace que los productores elijan opciones de tipo químico, ya que aceleran la germinación, el crecimiento y producción de los cultivos, sin considerar el daño que generan al suelo, al agua, a los alimentos y especialmente al consumidor final (Arias, 2010).

Por tanto, existe una necesidad urgente de utilizar a los microorganismos como promotores en el proceso de germinación, para el tratamiento de enfermedades y plagas, o para reemplazar los mecanismos químicos actualmente utilizados. Esto provocará una mejora en las características de los productos alimenticios, que a fin de cuentas se manifestará en el bienestar de los consumidores, en la reducción de la contaminación del suelo y en las mayores recompensas económicas para los trabajadores por su uso, ya que en comparación con la inversión necesaria para utilizar fertilizantes químicos se reduciría costos de producción.

2.2 Hongos entomopatógenos

Estos hongos son los más importantes en el control biológico de plagas e insectos, residen naturalmente en la naturaleza, en los remanentes del laboreo de cultivos y mayoritariamente en el suelo; adicional a eso, se conoce que a partir de otros organismos o materia orgánica obtienen sus nutrientes.

2.3 *Trichoderma* spp.

Hace dos siglos, Person presentó al género *Trichoderma* (Villegas Arenas, 2019), al cual lo constituye una serie de hongos filamentosos que forman parte del reino Mycetae (fungi), división

Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales (Monoliales) y familia Moniliaceae (Argumedo-Delira, Alarcón, Ferrera-Cerrato, & Peña-Cabriales, 2009).

Aunque según Samuels (2006), la clasificación del género *Trichoderma* sería “Reino Myceta (verdaderos hongos), División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae y Género de *Trichoderma* además de *Hypocrea*”

Las especies de *Trichoderma* son hongos transmitidos por el suelo que se utilizan ampliamente por sus numerosos beneficios para la salud de las plantas, como por ejemplo, conferir un mejor crecimiento, resistencia a enfermedades y tolerancia al estrés abiótico a sus huéspedes (Nieto, y otros, 2017).

Como se localiza en suelos ricos en materia orgánica, se clasifica en el grupo de hongos hipógeos, lignolícolas y depredadores; es un hongo aerobio y puede sobrevivir en suelos con pH neutro y ácido (Villegas Arenas, 2019).

Trichoderma spp., origina tres propágulos: hifas, clamidosporas y conidias (esporas). En términos de control biológico, las conidias son las más viables (Sivila & Álvarez Jujuy, 2013).

En la agricultura, el principal beneficio de *Trichoderma*, es su antagonismo frente a microorganismos fitopatógenos, ya que tiene la capacidad de segregar enzimas tóxicas extracelulares que provocan descomposición y eliminación de fitopatógenos (micoparasitismo), degradación de la pared celular de hifas (depredación), generación de sustancias químicas impalpables y antibióticos que inhabilitan el desarrollo de hongos basidiomicetos (amensalismo que es la competitividad por oxígeno, nutrientes y espacio en el suelo beneficiada por la gran adaptabilidad y rápido crecimiento de *Trichoderma* (Villegas Arenas, 2019).

2.4 *Trichoderma harzianum*

T. harzianum es un hongo cosmopolita, ya que se distribuye a nivel mundial en diversos ecosistemas y entornos naturales, siendo habitual su desarrollo en sitios donde se acumula material vegetal orgánico, como restos de cosechas o suelos húmicos (Villegas Arenas, 2019); se adaptan a diversos ambientes, facilitando así su distribución a cualquier entorno, así también son reconocidos por la generación característica de toxinas y antibióticos (Seaby, 1996).

T. harzianum tiene un amplio rango de producción de enzimas hidrolíticas y quitinolíticas, por lo que ostenta una poderosa capacidad para realizar interacciones parasíticas y simbióticas con plantas y microorganismos. Estudios han demostrado, que este hongo tiene una variedad de mecanismos antagonistas en el control de fitopatógenos como los efectos antibacterianos, interacción directa con patógenos (micoparasitismo y lisis enzimática), inducción de resistencia, competencia por nutrientes y espacio (Lorito, 2006), es por eso que esta especie es utilizada en la agricultura como biocontrolador de enfermedades así también como bioestimulante o biofertilizante.

Una vez que el producto ha sido formulado, el hongo se puede aplicar fácil y directamente a suelo, semillas y plantas mediante cualquier método tradicional. Cuando se aplican hongos a las raíces, el mecanismo de acción simbiótico empieza formando una cobertura de defensa, ocasionando que las raíces estén protegidas y al mismo tiempo hace que el hongo se alimente de las secreciones de las raíces provocando una disminución de nutrientes para los organismos patógenos, así como se evita que fitopatógenos ingresen a las raíces de las plantas. El efecto que se produce es solo por competencia con otros hongos patógenos para nutrimentos y espacio (Andrade, 2012).

2.4.1 Clasificación taxonómica

Agrios (2005), clasifica taxonómicamente a *T. harzianum* como:

- Reino: Mycetae
- División: Eumycota
- Subdivisión: Deuteromycotina
- Clase-Forma: Hyphomycetes
- Orden-Forma: Hyphales (Moniliales)
- Género-Forma: *Trichoderma*
- Especie: *Trichoderma harzianum*

2.4.2 Morfología

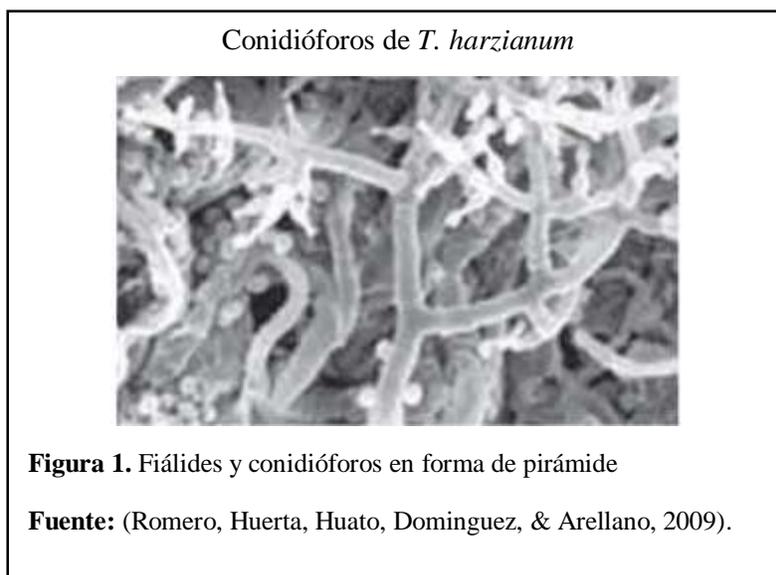
En los primeros días de *T. harzianum*, el color del micelio es blanco y finalmente se vuelve verde oscuro después de la formación de las esporas. Después de su incubación en medio de agar de dextrosa y papa (PDA) a 25 ° C durante cinco días, la colonia de *T. harzianum* crece ágilmente y madura. Las especies de este género generalmente prefieren valores de pH ácido de 4,5 a 5. Además, crece en áreas donde la humedad es alta y el dióxido de carbono se estanca en el aire (Pandey & Tewari, 1990).

T. harzianum, en su ciclo de vida, empieza con el crecimiento y ramificación de un micelio fúngico típico con un diámetro de 5-10 µm (Seaby, 1996). Cuando el diámetro de las esporas del hongo alcanza de 3 a 5 µm, se produce la formación asexual de esporas y se libera una gran cantidad de ellas. Además de la esporulación, también se forman clamidosporas, que se encuentran dispersas en hifas individuales o en las ramas laterales cortas.

En estudios previos sobre *T. harzianum*, se han distinguido cuatro biotipos: Th1, Th2, Th3 y Th4, dependiendo del porcentaje de crecimiento del micelio y la apariencia de la colonia formada, así como las características morfológicas microscópicas, incluidas fiálides y fialósporas (esporas que

tienen base inflada y forma de pera). Entre los biotipos diferenciados, Th2 y Th4 son los biotipos que más afectan el cultivo de hongos comestibles y son los más resistentes a los virus que destruyen los cultivos, mientras que los biotipos Th1 y Th3 tienen la capacidad de infectar compost de hongos, y en casos raros pueden causar la pérdida de cultivos de hongos comestibles (Romero, Huerta, Huato, Dominguez, & Arellano, 2009).

En esta especie, se destaca la disposición de las ramificaciones de forma piramidal, también el tamaño de sus conidióforos varía de $62,5$ a 69×3 a $4,7 \mu\text{m}$. Estas microestructuras son de color verde y con múltiples ramas que están orientadas verticalmente. En algunos casos se puede observar una formación con dos o tres ramas horizontales dispuestos en grupos en un ángulo amplio, como se muestra en la figura 1.



Las estructuras como las fiálides son largas y delgadas, conocidas como células conidiógenas que presentan forma de florero, se distribuyen de forma autónoma a lo largo del eje, con un tamaño de $6,3$ a $15,6 \times 2,7$ a $3,4 \mu\text{m}$, con forma citriforme (como limón) y casi esférica. Las clamidosporas se encuentran dispersas y están formadas por un micelio sumergido, son casi esféricas, con paredes

irregulares, de color verde y de 10 a 12,5 μm de tamaño (Romero, Huerta, Huato, Dominguez, & Arellano, 2009).

2.4.3 Condiciones de crecimiento

El factor principal en el desarrollo de *T. harzianum* es el ciclo alterno de luz y oscuridad, que favorece la colonización del sustrato. El pH para su crecimiento debe estar entre un 2 y 9 (óptimo de 4 a 7). La temperatura de crecimiento está entre 10 °C a 40 °C (óptima de 25 °C). La humedad alrededor del 70 % y 80 %. Los requerimientos nutricionales de *T. harzianum* son bien conocidos; puede asimilar sustratos de alta complejidad estructural, como almidón, pectina y celulosa, y debido a que posee un enorme complejo enzimático hidrolítico como amilasa, pectinasa, celulasa y quitinasa, etc., se pueden utilizar como ventaja contra fitopatógenos. Asimismo, también procesa como fuentes de nitrógeno compuestos como aminoácidos, amoníaco, nitrito, sulfato de amonio y urea (Nugra, 2018).

2.4.4 Mecanismos de acción

En el ámbito biocontrolador de este hongo, se distinguen algunas acciones directas frente a hongos fitopatógenos, las cuales colaboran con la capacidad de *Trichoderma* para desarrollarse en la rizósfera de las plantas.

2.4.4.1 Micoparasitismo

Se define como “una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, y que corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados” (Lorenzo, 2012, págs. 23-24).

Se produce en cuatro fases y cada una se desarrolla de acuerdo al hongo correspondiente, de las condiciones ambientales y de la participación necrotrófica o biotrófica del microorganismo antagonista:

- Crecimiento quimiotrópico: es la localización del hospedante. *Trichoderma* puede localizar el huésped y sus hifas de forma remota, debido a la detección de un estímulo de tipo químico, provocando su crecimiento en dirección hacia el patógeno.
- Reconocimiento: mediante interacciones lectina-carbohidrato. Se produce una interacción entre los elementos de la superficie celular y el entorno extracelular gracias a las lectinas.
- Adherencia y enrollado: *Trichoderma* se adhiere mediante sus hifas a las del huésped a través de apresorios que se enrollan en el huésped. La unión de las hifas se produce mediante la combinación de la lectina de la pared del patógeno con un azúcar de la pared del antagonista.
- Actividad lítica: Distintas enzimas como celulasas, glucanasas, lipasas, proteasas y quitinasas son secretadas por *T. harzianum*, las cuales participan en la lisis de la pared celular hifal del huésped, lo que facilita la entrada de estructuras específicas, así como de sus hifas para que se beneficien de los nutrientes localizados en el interior del fitopatógeno.

Esta simbiosis antagónica, finaliza con la disminución del citoplasma de la célula huésped, reduciendo así su actividad patógena (Infante, Martínez, González, & Reyes, 2009).

2.4.4.2 Competencia

Para que exista competencia, es necesario la limitación o escasez de la demanda de nutrientes y espacio, entonces se provoca una situación en la que dos o más organismos frente a las mismas

exigencias, no puedan tener el mismo desempeño debido a que siempre uno limita la cantidad del otro organismo (Martínez, Infante, & Reyes, 2013).

Trichoderma ha probado que es un gran acaparador por el espacio y los recursos nutritivos como carbono, nitrato y hierro, debido a su presencia en suelos agrícolas y ecosistemas (Hjeljord & Tronsmo, 1998), y su plasticidad ecológica (Infante, Martínez, González, & Reyes, 2009).

Mayoritariamente, características que benefician la idoneidad del antagonista son una elevada tasa de crecimiento de sus aislados y la producción de metabolitos de diferentes propiedades, que provocan lentitud y hasta la eliminación de sus competidores. Esta forma de actuar incide en la "propagación" de patógenos y es muy importante para la propagación de antagonistas (Martínez, Infante, & Reyes, 2013).

2.4.4.3 Antibiosis

“Es la acción inmediata de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico es inminente” (Lorenzo, 2012, pág. 34).

En varios estudios hasta el momento, se han reconocido componentes como “alquilpironas (6- α -pencil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichoianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina)” (Howell, 2003, págs. 4-10).

2.4.4.4 Actividad lítica

En esta fase ocurre una producción de liasas extracelulares, principalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan la pared celular del huésped y permiten que las hifas penetren en el

antagonista por lisis y mediante poros que hacen posible el contacto. Las actividades de las enzimas de *Trichoderma* se han estudiado exhaustivamente y sus posibles funciones micoparasitarias (Lorenzo, 2012, pág. 28).

2.4.5 Beneficios

Entre las ventajas de este hongo, Gupta, et al. (2014), indica:

- Gracias a la acción de metabolitos secretados, incita el desarrollo de la planta y promueven su crecimiento, así como de su raíz permitiéndole absorber mejor los nutrientes.
- Es una pieza esencial en procesos de degradación de materia orgánica, ya que transforma nutrientes en su forma asimilable, por lo tanto, tiene un impacto indirecto en la subsistencia de los cultivos.
- Actúa como eficaz antagonista frente a *Pythium*, *Armillaria*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora*, los mismos que son causantes de pudriciones a nivel de raíz.
- Procede simultáneamente con hongos entomopatógenos controladores de plagas.
- Interviene en la prevención de enfermedades radiculares y de follaje a través de su capacidad protectora.
- Disminuye el uso de fungicidas tóxicos preservando recursos naturales.
- Es un microorganismo que no causa efectos nocivos en el hombre ni en controladores biológicos.

2.4.6 Importancia agrícola como agente de biocontrol

Gracias a que *T. harzianum* es un hongo que habita la rizósfera y es considerado un simbiote oportunista de plantas, puede promover la generación de iniciadores que estimulen la defensa de plantas contra patógenos e insectos, ayudar a disolver el fósforo y originar la síntesis de sustancias

que promuevan el crecimiento de las plantas (Djonovic, y otros, 2007); (Hohmann, Jones, Hill, & Stewart, 2011). No solo se caracteriza como un fungicida biológico y un biocontrolador, sino también tiene la habilidad de producir enzimas que pueden degradar desechos orgánicos sólidos, por lo que puede promover la mineralización y el reciclaje de desechos (Diorio, Forchiassin, Papinutti, & Sueldo, 2003); (Marques, Matos, Gírio, Roseiro, & Santos, 2017); (Idris, Pandey, Rao, & Sukumaran, 2017).

Este hongo está vinculado a la rizósfera, por lo que puede impulsar el desarrollo y crecimiento de las plantas a través de la producción de auxinas y giberelinas, así también originar ácidos orgánicos (glucónico, fumárico y cítrico) que pueden reducir el pH del suelo y promover la disolución de fosfato, magnesio, hierro y manganeso, que son esenciales para el metabolismo de las plantas (Torres-De la Cruz, y otros, 2015); (Sharma, Salwan, & Sharma, 2017).

Asimismo, es un microorganismo muy importante en el ámbito vegetal, porque tiene propiedades micoparasitarias y antibióticas, que ayuda a controlar hongos fitopatógenos, por lo que ciertas especies están catalogadas como extraordinarios agentes de control biológico de hongos fitopatógenos (Argumedo-Delira, Alarcón, Ferrera-Cerrato, & Peña-Cabriales, 2009).

Ramos, Navarro, Zumaqué & Violeth (2008) afirman que “este hongo toma nutrientes de los hongos que parasita y de materiales orgánicos, ayudando a su descomposición, por lo cual las incorporaciones de materia orgánica y compostas favorecen su proliferación” (págs. 23-24).

2.5 Sistemas de producción de *Trichoderma*

“A pesar de que las especies de *Trichoderma* spp., han sido evaluadas durante más de 70 años como antagonistas de hongos fitopatógenos, sólo hasta inicios del siglo XXI se empezaron a comercializar como biocontroladores agrícolas” (Pineda-Insuasti, y otros, 2017, pág. 1).

Esto pudo suceder debido a cambios en la demanda del mercado de alimentos, donde cada vez hay más personas que exigen que los productos que consumen sean libres de pesticidas inorgánicos.

Pineda-Insuasti, y otros (2017) afirman que “la producción de biopreparados fúngicos para control biológico tiene como objetivo transportar el mayor número posible de propágulos (conidias, para este caso) viables que pueden infectar a los hongos patógenos” (pág. 2).

“Para la formulación de biopreparados estables, las estructuras morfológicas deben permanecer viables durante mucho tiempo antes y después de uso, con un tiempo mínimo de caducidad de 18 meses a 20 °C” (Deshpande, 1999, págs. 229-243). Sin embargo, uno de los principales obstáculos de su comercialización y posterior uso, es la correcta formulación de los biopreparados que aseguran su facilidad de utilización, costos de producción bajos, inóculo con adecuada concentración y viabilidad de esporas (Fravel, 2005), así también que a mediano y largo plazo, una vez aplicado al suelo o sustrato, se pueda mantener la densidad inicial de inóculo (Martínez-Medina, Roldán, Lloret, & Pascual, 2008).

La fermentación es un conjunto de procedimientos en los que los microorganismos procariotas (bacterias) y eucariotas (microalgas, levaduras, hongos) transforman sustratos sólidos o líquidos en productos de alto valor agregado, para ser usados por el hombre (Vuppala, Krishna, & Murthy, 2015); (Ashok, Doriya, Rao, & Kumar, 2017). De este modo, en el ámbito industrial, la manufactura de compuestos biológicos mediante fermentación se pueden producir en sustratos bifásicos, sólidos o líquidos estáticos y agitados (Elósegui, 2006), (Subramaniyam & Vimala, 2012).

2.5.1 Fermentación en estado líquido

Este tipo de fermentación emplea sustancias solubles en agua en el proceso de crecimiento microbiano y reproducción de biomasa. El medio seleccionado debe ser barato, fácil de obtener y poseer un equilibrio adecuado de nutrientes como por ejemplo la melaza y sustratos que contengan vitaminas, azúcar, sales minerales, etc. (Hernández-Melchor, Ferrera-Cerrato, & Alárcón, 2019).

Es también conocida como fermentación sumergida, se la realiza en tanques especiales (biorreactores) considerando condiciones anaeróbicas o aeróbicas, en este tanque el aire se puede suministrar mediante sistemas de agitación neumáticos, mecánicos o una combinación (Vuppala, Krishna, & Murthy, 2015). A diferentes escalas de producción, las configuraciones de biorreactores aeróbicos más estudiadas incluyen tanques agitados, torres de burbujeo y extracción de gases (de Jesús, Moreira, & Maciel, 2017); los cuales a nivel industrial son manejados para la producción de enzimas (Ashok, Doriya, Rao, & Kumar, 2017). Es por eso que, en comparación con la fermentación en estado sólido, la fermentación sumergida produce más del 75 % de enzimas microbianas (Subramaniyam & Vimala, 2012).

2.5.2 Fermentación en estado sólido

Es apto el uso de la fermentación sólida en procedimientos que buscan el crecimiento adecuado de microorganismos mediante la utilización de materias primas no solubles en agua (como se trata de un proceso estático la cantidad de agua que se utiliza no debe sobrepasar el límite de saturación del sólido en el que crecerán los microorganismos, ya que si el contenido de oxígeno es menor afectará indudablemente a la fermentación (Subramaniyam & Vimala, 2012); (Kumar, Thaku, & Rani, 2014); (Vuppala, Krishna, & Murthy, 2015).

La eficiencia de los biopreparados depende principalmente de cuál fermentación se elija, así como de la concentración del inóculo, viabilidad-estabilidad de conidias y bajos costos de producción; es por eso que es una buena opción utilizar una fermentación en estado sólido usando residuos agroindustriales los cuales han demostrado ser fáciles de conseguir, de manipular y de ofrecer un producto final abundante.

Este sistema presenta ventajas en procesos biotecnológicos, ya que posee una alta adaptabilidad de los microorganismos y por lo tanto éstos producen enzimas para degradar las sustancias sólidas proporcionadas aprovechando sus nutrientes para sobrevivir (Granda, Mejía, & Jimenez, 2005).

2.6 Sustratos

El sustrato que se utilice para la producción de microorganismos, debe poseer los elementos necesarios para una correcta síntesis del material celular y producción de metabolitos (Poalacín Cabascango, 2015).

Para producir *Trichoderma* se suelen utilizar como materia prima ciertos materiales o compuestos de origen agrícola o subproductos de las agroindustrias, por lo que se elige residuos que contengan ingredientes orgánicos ya que así se reemplaza la necesidad de nutrientes para el microorganismo, así también se los puede obtener a un costo económico (Poalacín Cabascango, 2015).

En el cultivo de *Trichoderma*, cuando se producen conidias, el elemento más encontrado es el carbono, y el porcentaje de nitrógeno se convierte en un factor limitante para su crecimiento. En la producción de *Trichoderma*, como en otros procesos, la proporción carbono-nitrógeno (C/N) es de suma importancia; ya que de ellos depende que se dé la esporulación (Poalacín Cabascango, 2015).

Pineda, et al. (2015), señalaron que cuanto menor es el tamaño de la partícula del sustrato, tiende a proporcionar un área mayor para el contacto entre la hifa y la partícula, lo que logrará la mejor

circulación de aire (generalmente debe existir una circulación entre el 20 % al 60 % de agua con relación a su volumen total).

2.7 Desechos agroindustriales

La agroindustria tiene como objetivo “combinar los procesos productivos agrícolas con los procesos productivos industriales con el fin de obtener alimentos o materiales semielaborados para ser destinadas al mercado” (Vargas & Pérez, 2018, pág. 60), ésta se puede dividir en dos categorías, la primera está compuesta por industrias alimentarias y no alimentarias, y la segunda conformada por proveedoras de materias primas como trigo molido y arroz; así también los consumidores de materias primas como para la fabricación de pan.

Los residuos agroindustriales son “materiales en estado sólido o líquido que se obtienen del consumo directo de productos primarios o que se obtienen de su industrialización” (Vargas & Pérez, 2018, pág. 60), pues así ya no son útiles en el proceso de producción que los generó, pero pueden ser utilizados o transformados para la obtención de otro producto con un valor comercial, económico o social.

Las propiedades químicas y biológicas de estos residuos dependen del proceso de modificación y de la materia prima utilizada. Sin embargo, los residuos agrícolas son materiales lignocelulósicos, es decir “el contenido de celulosa, lignina y hemicelulosa representa el porcentaje de composición más alto” (Saval, 2012, págs. 14-16).

Es por eso, que es una propuesta interesante el estudio y uso de diferentes residuos orgánicos agroindustriales para la producción de *T. harzianum* y así observar su eficiencia para proveer los nutrimentos imprescindibles que necesita el hongo para su desarrollo.

2.7.1 Arroz (*Oriza sativa*)

El arroz es el principal alimento en diecisiete países de la región de Asia y el Pacífico, nueve de América del Norte y Sur, como ocho de África. Este grano brinda el 20 % del suministro energético de alimentos a nivel mundial. El arroz es una buena fuente de tiamina, niacina y riboflavina, así como de energía. Las características de aminoácidos del arroz presentan altos contenidos de ácido aspártico y glutámico, mientras que la lisina es un aminoácido limitante (FAO, 2004).

2.7.1.1 Composición química

Es el grano con mayor contenido de almidón, y su estructura química es relativamente simple, básicamente el almidón está compuesto por dos proporciones diferentes de polímeros que son la amilosa (16 % - 30 %) y la amilopectina (68 % - 85 %). La amilosa es un polímero de glucosa conectado por enlaces α -1,4 glucosídicos (lineales) y la amilopectina al contrario es un polímero altamente ramificado incluyendo enlaces α -1,6 glucosídicos en sus puntos de ramificación. En efecto, *Trichoderma* hidroliza los polímeros de almidón por enzimas como α – amilasas, glucoamilasas, β – amilasas, de modo que el micelio crezca y produzca esporas (Poalacín Cabascango, 2015).

2.7.2 Maíz (*Zea mays*)

El maíz es uno de los tres granos fundamentales en la nutrición de la mayoría de las personas a nivel global.

El maíz se encuentra dentro de la categoría de gramíneas con una producción mundial de 645 toneladas. En Ecuador se produce en las provincias de los Ríos y Guayas un 73, 41 %, en las provincias de Cotopaxi, Bolívar y Azuay el área que se cultiva es menor (Andrade, 2012). Cuando el maíz alcanza una humedad del 22 % al 24 % está listo para su recolección.

El cultivo produce una gran cantidad de biomasa aérea, de la cual el 50 % se cosecha en forma de grano para industrias alimenticias y el resto en las estructuras vegetales como caña, cáscara, hojas y mazorcas que usualmente son utilizadas en otras industrias. El rendimiento de biomasa residual que produce el maíz oscila entre 20 y 25 ton/ha (Nugra, 2018).

2.7.2.1 Composición química

La pared celular tiene poco porcentaje de celulosa y se caracteriza por tener un valor alto de hemicelulosa. Al presentar un porcentaje bajo de lignina en el resto de la planta, hace que sea más digerible que la paja de cereal, siendo también rico en azúcares solubles. Por estos motivos, el valor energético de este residuo es mayor al de la paja de otros cereales, oscilando entre 1,69 y 2,1 Mcal/k (Pasturas de América, 2016).

Hay muchos minerales del maíz presentes en los residuos que quedan en el campo. Cerca del 30 % de los minerales K, P, N y Ca forman parte de esa estructura. El contenido de lignina en el mismo se encuentra entre 14,6 % y 17,9 %, mientras que el de celulosa se encuentra entre 57 % y 59,2 % (Tipán, 2016).

Las brácteas de protección de la inflorescencia femenina del maíz se las conoce mejor como hojas de la mazorca del maíz y su composición se puede observar en la tabla 1

Tabla 1

Composición química de las brácteas de protección de la inflorescencia femenina del maíz.

Compuesto	%
Holocelulosa	78,86
α -celulosa	43,14

Lignina	23,00
Cenizas	0,76

Fuente: (Hurter, 1997).

2.7.3 Ajo (*Allium sativum*)

El ajo (*Allium sativum*) es una especie se encuentra en la familia Amaryllidaceae, la cual se encuentra conformada por 600 especies.

El ajo contiene muchos ingredientes activos, de los que sobresalen los compuestos azufrados. Si el bulbo está fresco e intacto, el componente principal es la aliína, que es una sustancia inestable e insípida, y así mismo otros compuestos como los sulfóxidos. Además, existen sales minerales, lípidos, azúcares, aminoácidos esenciales, terpenos, compuestos fenólicos, vitaminas, etc.

Se dice que la alicina funciona contra bacterias gramnegativas y grampositivas, aunque parece que el ajoeno y el trisulfuro de dialilo también actúan sobre estas. El ajo también tiene un efecto antifúngico porque ha demostrado su actividad contra *Candida* mayoritariamente (López, 2007).

Con respecto a la cáscara de ajo (catáfila externa), ésta tiene adheridas moléculas propias del bulbo, lo que le confiere el fuerte olor característico. Están compuestas por vitaminas como la B6 y minerales como el selenio y magnesio.

2.7.3.1 Composición química

Tabla 2

Composición química del ajo

Componente	Cantidad
Agua	58,58 g

Energía	149 kcal
Proteína	6,36 g
Lípidos totales	0,5 g
Carbohidratos (por diferencia)	33,06 g
Fibra dietética	2,1 g
Azúcares totales	1 g

Nota: Datos obtenidos en 100 g de ajo fresco

Fuente: (Delgado-Olivares, Betanzos, & Sumaya, 2010).

Elaborado por: Las autoras, 2020.

2.7.4 Fréjol (*Phaseolus vulgaris*)

El fréjol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es la leguminosa de mayor importancia de consumo del ser humano, ya que es una significativa fuente de calorías, vitaminas, proteínas y minerales, también es rico en bioactivos como inhibidores de lecitinas, enzimas, etc. (Fernández & Sánchez, 2017).

2.7.4.1 Composición química

Las propiedades nutricionales del fréjol se relacionan con su alto contenido en proteínas y en menor cantidad con su contribución de carbohidratos, minerales y vitaminas. Dependiendo del tipo de fréjol, las proteínas oscilan con su contenido entre el 14 % y 33 %, es rico en aminoácidos como la lisina (6,4 a 7,6 g/100 g de proteína) y la fenilalanina más tirosina (5,3 a 8,2 g/ g de proteína), pero con una cantidad menor de aminoácidos azufrados de metionina y cisteína.

El fréjol ofrece una gran aportación de fibra, cuyo valor se sitúa entre 14 – 19 g/ 100 g de la semilla en crudo, la mitad de los cuales se encuentra en forma soluble. Los componentes químicos principales de la fibra de fréjol son los pentosanos, pectinas, hemicelulosas, lignina y celulosa. Este

alimento también es una fuente considerable de hierro, calcio, zinc, magnesio, fósforo, así como las vitaminas niacina, ácido fólico y tiamina (Ulloa, Ulloa, Ramírez, & Ulloa, 2011).

La cáscara de fréjol contiene sustancias llamadas antocianinas, que en su estructura tiene un ion inestable que se llama flavilio, una apreciable cantidad de celulosa y lignina, que puede ser aprovechada (Camacho & Salgado, 2019); así también posee una gran cantidad de agua la cual favorece el crecimiento de microorganismos (Barahona & Rivera, 2006).

2.7.5 Tomate (*Solanum lycopersicum*)

El tomate pertenece a la familia de las solanáceas (Solanaceae), es nativo de Centroamérica y México, del norte y noroeste de Sudamérica. Es una planta herbácea anual. El tallo de la planta joven es erguido y cilíndrico. A medida que crece, el tallo se cae y se pone córneo, la mayoría de sus órganos y glándulas tienen vellosidades y segregan una sustancia verde aromática, su longitud máxima puede alcanzar los 2,50 m, con abundantes ramas y yemas axilares (Torres, 2017).

2.7.5.1 Composición química

Casas, et al. (2008), publican un estudio en el que muestra que los desechos de la industria del tomate son una excelente fuente de nutrientes como proteínas, azúcares, aceites (75 % de ácidos grasos insaturados), carotenoides y ceras.

Entre los principales compuestos bioactivos que se pueden extraer de los residuos del tomate está la fibra, el aceite de las semillas y el licopeno (carotenoide responsable del color rojo y también es un poderoso antioxidante), el cual se encuentra en mayor concentración en la cáscara de tomate con un valor de 54mg/100g (Carmona, 2013).

Capítulo III

3. Materiales y métodos

3.1 Fase de laboratorio

3.1.1 Área de trabajo

La fase de laboratorio se desarrolló en los “Laboratorios de Ciencias de la Vida” de la Universidad Politécnica Salesiana, ubicados en el Campus El Girón de la Sede Quito, en la provincia de Pichincha-Ecuador.

3.1.2 Obtención de cepa y reactivación

La cepa identificada molecularmente de *T. harzianum* fue proporcionada por la colección de microorganismos de la Máster Laura Huachi. Los viales con hongo permanecían almacenados en glicerol al 10 % a una temperatura de -70 °C.

Para la reactivación se utilizó medio PDA dispensado en cajas Petri, en donde se colocó 1 mL de *T. harzianum*, y se mantuvo en incubación durante siete días a una temperatura de 26 °C.

3.1.3 Prueba microscópica y macroscópica de características fúngicas de *T. harzianum*

3.1.3.1 Características macroscópicas

Las colonias típicas de *T. harzianum* se pudieron observar fácilmente a los tres días de incubación debido a su rápido crecimiento y coloración blanca, a los cuatro o cinco días cambiaron de coloración a verde debido a que ya se produjo la esporulación del hongo y es en donde se encuentra en un punto de reproducción máximo. Se puede observar esas características en las figuras 2 y 3.

T. harzianum en medio PDA



Figura 2. Colonias de *T. harzianum* de tres días de crecimiento en PDA

Elaborado por: Las autoras, 2020.

T. harzianum en medio PDA



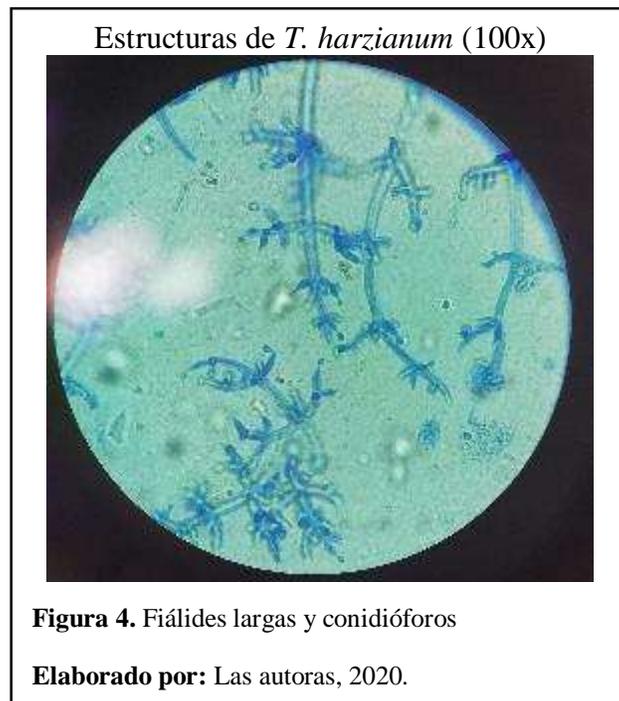
Figura 3. Colonias de *T. harzianum* de cinco días de crecimiento en PDA

Elaborado por: Las autoras, 2020.

3.1.3.2 Características microscópicas

Para poder identificar estructuras a nivel microscópico de *T. harzianum* se necesitó de un microscopio y con la ayuda de estudios de Rifai (1969) y Hoog, Guarro, Gene, & Figueras (2000) se pudo corroborar que se trabajó con *T. harzianum*, ya que se pudo observar detalladamente estructuras como conidióforos (figura 4) que mostraron varias ramificaciones verticales, y en

algunos casos se observó una distribución de las ramas laterales con ángulos amplios en grupos de dos a tres. Se observó ramificaciones con forma piramidal, en donde las fiálides se encontraron largas y delgadas (figura 4), solitarias y asimétricas a lo largo del eje con hasta cuatro conidios con forma redondeada y casi esféricos (figura 5). Sus clamidosporas se ubican en el medio y se encuentran constituidas por un micelio sumergido, casi esférico, con paredes irregulares y de un ligero color verde.



Conidias de *T. harzianum* (100x)

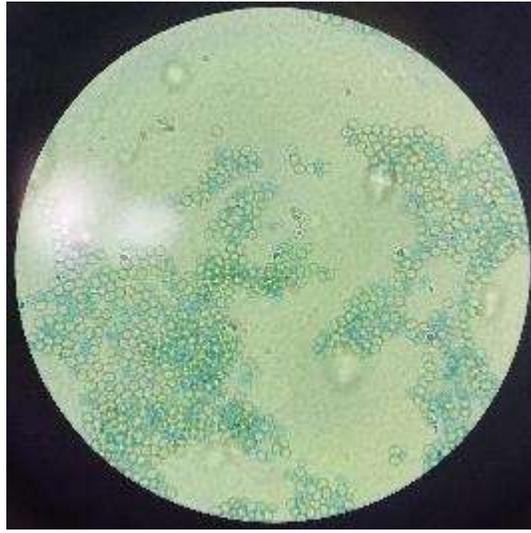


Figura 5. Numerosas esporas globosas del hongo

Elaborado por: Las autoras, 2020.

3.1.4 Proceso experimental

3.1.4.1 Tratamientos

Los cinco sustratos elegidos como potenciales para la propagación de *T. harzianum*, se obtuvieron a partir de los residuos de la actividad agrícola de las productoras de la ASOCAMCAY. La tabla 3 presenta la descripción de denominación a los sustratos, así como el porcentaje de humedad que tenían el momento de ser utilizados.

Tabla 3

Descripción y denominación de los tratamientos

Tratamiento	Descripción	Denominación	Porcentaje de Humedad
Arroz	Grano entero, se lavó con agua hasta que soltara todo el almidón, se coció en agua por 5 min, se escurrió	S1	52,38
Maíz	Brácteas protectoras de la inflorescencia femenina (mazorca), se cortó con un bisturí en cuadrados de 1cm ²	S2	86,98
Ajo	Catáfila externa seca que protege al bulbo, se trituró en una licuadora casera	S3	83,11
Fréjol	Vaina verde, se cortó con un bisturí en cuadrados de 1cm ²	S4	81,99
Tomate	Epicarpio, con un bisturí se separó el epicarpio del endocarpio y se cortó en pedazos de 1cm ²	S5	47,76

Elaborado por: Las autoras, 2020.

3.1.4.2 Unidad experimental

La unidad experimental la conformó un envase de vidrio de 250 mL, conteniendo 20 g de sustrato. Cada unidad experimental fue esterilizada en autoclave por 25 min a 15 PSI para posteriormente ser enfriadas por 15 min en una campana de extracción.

3.1.5 Diseño experimental

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cinco repeticiones para cada tratamiento y la prueba de separación de media Tukey al nivel de significancia 0,05.

3.1.6 Variables

3.1.6.1 Conteo de conidias

La determinación de la concentración de conidias se efectuó con una cámara hematómetra de Neubauer. Se realizó el conteo cuatro veces (7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación) para cada tratamiento y repetición.

De cada repetición para los cinco tratamientos, en la cámara de flujo, se retiró 1 g de sustrato con hongo, el cual se incorporó a 100 mL de agua de tipo destilada.

La fórmula que se utilizó para el conteo de conidias fue la propuesta por (Troya & Vaca Granda, 2014) :

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = \frac{\text{esporas contadas en los 2 campos de la cámara}}{\text{superficie recontada (mm}^2\text{) x profundidad (mm) x dilución}}$$

Se realizó diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de cada repetición, para poder conocer cuál tratamiento poseía una concentración de 1×10^8 ufc/mL, ya que esa concentración sería la ideal para emplear en campo, pues al momento de su aplicación disminuye su concentración hasta dos coeficientes y la ideal es 1×10^6 y 1×10^8 ufc/mL (Cooney, Lauren, Jensen, & Perry-Meyer, 1997), (Crozier, y otros, 2015).

3.1.6.2 Viabilidad de conidias

Para determinar la viabilidad de las conidias de cada repetición para los cinco tratamientos, en la cámara de flujo, se retiró 3 g de sustrato con hongo y se colocó en 500 mL de agua de tipo destilada.

Para cada repetición de los cinco tratamientos, se realizó dos repeticiones en cajas Petri dispensadas con medio PDA, en donde se sembró 100 conidias (0,1 mL por caja), a partir de una suspensión de 1×10^3 de la dilución madre. Después de la siembra, se esperó 48 horas y se contabilizó las conidias germinadas y no germinadas mediante la ayuda de un microscopio.

La fórmula que se utilizó para el porcentaje de viabilidad de conidias fue la propuesta por (Troya & Vaca Granda, 2014):

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{conidias germinadas} - \text{no germinadas}}{\text{germinadas}} \times 100$$

3.1.7 Inoculación

En las cajas Petri sembradas con el hongo reactivado, se colocó 10 mL de agua de tipo destilada y se raspó suavemente con un asa microbiológica para obtener una suspensión de conidias que presentó coloración verde esmeralda.

Se colocó en cada sustrato 3 mL de la dilución previa a 1×10^3 ufc/mL de concentración. Los sustratos inoculados se mantuvieron en una incubadora a 26 °C durante cuatro semanas con una evaluación de conidias semanal. Desde el tercer día, con movimientos suaves, cada botella se agitaba para facilitar la homogenización del hongo en todo el sustrato.

3.2 Fase de campo

3.2.1 Ubicación

La fase campo se realizó en la unidad de producción agropecuaria de propiedad de la señora Marisol Andrango, socia de la ASOCAMCAY situada en la comuna de Cananvalle, en la Parroquia

Tabacundo del Cantón Pedro Moncayo al norte de la provincia de Pichincha-Ecuador, cuyas coordenadas geográficas son las siguientes: 0°01'28.7"N; 78°12'12.5E.

La figura 6 corresponde a una imagen satelital de la ubicación exacta de sitio de la UPA donde se llevó a cabo la fase de campo.

Foto satelital de la UPA finca propiedad de Marisol Andrango, socia de la ASOCAMCAY



Figura 6. Finca propiedad de Marisol Andrango, área que se utilizó para la investigación (cuadro rojo).

Fuente: (Google Earth, 2020).

3.2.2 Características ambientales de la zona

Cananvalle se encuentra a una altitud de 2.376 msnm, presenta un clima frío, variando entre los 8 °C a 14 °C promedio, humedad de 15 % y vientos de 15 a 28 km/h.

De acuerdo con los reportes de los estudios de suelos realizados en el sitio, se tiene un suelo de origen volcánico, predominando limo-arcillosos y los limo-arenosos, con presencia esporádica de gránulos de pómez, grumos de cangagua y ventillas de yeso (EmelNorte, 2015).

3.2.3 Proceso experimental

3.2.3.1 Tratamientos

La tabla 4 describe los tratamientos que fueron probados y denominación dada a cada uno de ellos.

Tabla 4

Descripción y denominación de los tratamientos probados en la fase de campo

Tratamiento	Concentración <i>Trichoderma harzianum</i>
T1	0 (testigo), sin aplicación de <i>T. harzianum</i>
T2	1×10^8 ufc/mL (conidias de <i>T. harzianum</i>)
T3	1×10^{10} ufc/mL (conidias de <i>T. harzianum</i>)

Elaborado por: Las autoras, 2020.

3.2.3.2 Unidad Experimental y distribución de tratamientos

La unidad experimental estuvo constituida por una parcela de 4 m de largo por 1,6 m de ancho, donde se ubicaron un total de 40 puntos de siembra constituidos cada uno de ellos por dos semillas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) de la variedad Canario del Chota INIAP 420.

En cada parcela se practicaron 4 surcos de 4 m de largo, donde se ubicaron 10 puntos de siembra, a una distancia de 0,4 m. La distancia entre surcos fue de 0,4 metros. De esta manera la distancia de siembra fue de 0,4 x 0,4 m.

El total del área experimental fue 81,60 m² que albergaron 4 repeticiones para cada uno de los tratamientos. La figura 7 muestra la distribución de las unidades experimentales y los tratamientos, así como los puntos de siembra.

Distribución de las unidades experimentales, tratamientos y puntos de siembra

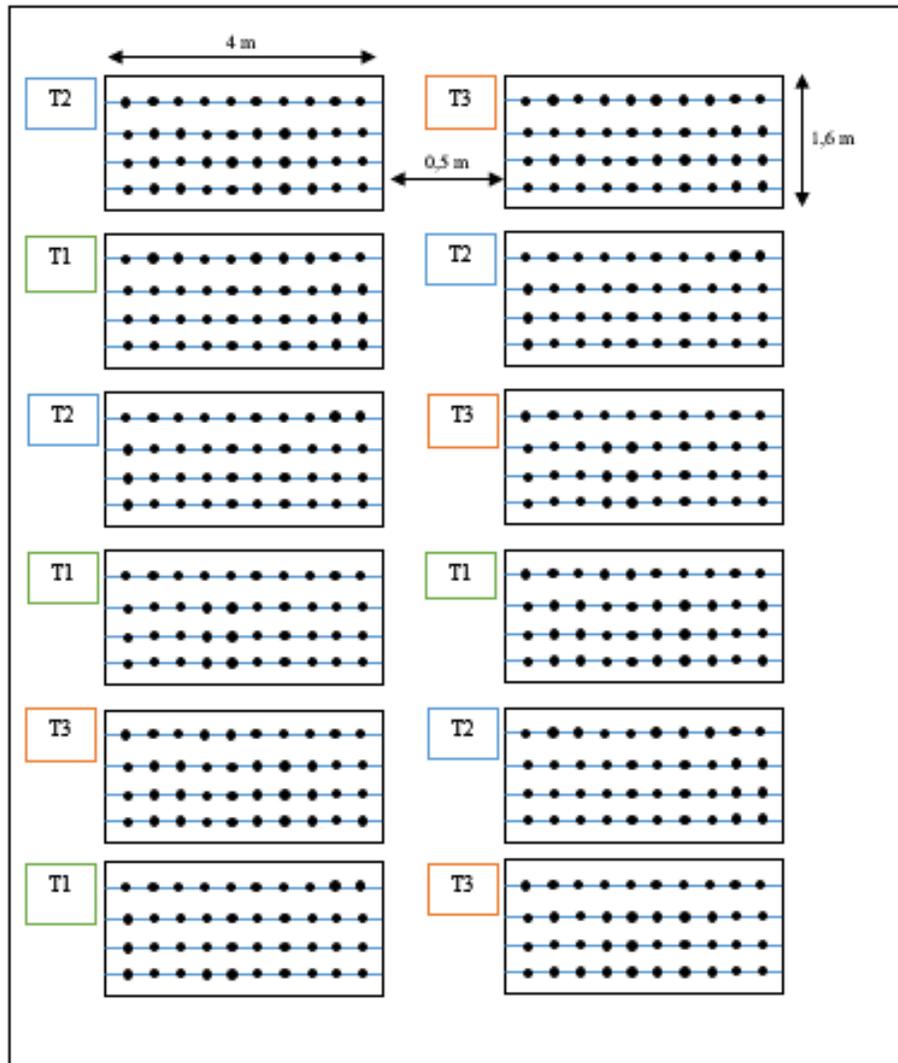


Figura 7. Ubicación de los tratamientos en DCA

Elaborado por: Las autoras, 2020.

3.2.3.2.1 Semilla

Se utilizó semillas certificadas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) de la variedad Canario del Chota INIAP 420, debido a que posee características que permiten que se desarrolle muy bien en la zona donde se realizó la fase de campo. Hay que recalcar que las semillas adquiridas se encontraban cubiertas con VITAVAX (fungicida) pero al momento de colocarlas en los surcos de tierra se

lavaron con agua potable para que quedaran lo más limpias posibles. La tabla 5 muestra las características de la variedad.

Tabla 5

Características importantes de la variedad de Fréjol (*Phaseolus vulgaris*) Canario del Chota

INIAP 420

Altura de planta	30 a 50 cm
Color de la flor	Rosada
Largo de la vaina	11 a 17 cm
Color del grano tierno	Blanco
Color del grano seco	Amarillo
Forma del grano	Ovalado
Tamaño del grano seco y tierno	Grande
Días a floración	48 a 55
Días a la cosecha en verde	85 a 95
Días a la cosecha en seco	100 a 110
Número de vainas por planta	12 a 15
Número de granos por vaina	3 a 6
Peso de 100 granos secos	52 a 62 g
Adaptación	1.400 a 2.400 msnm

Fuente: (INIAP, 2003).

Elaborado por: Las autoras, 2020.

3.2.3.3 Manejo específico del proceso experimental

3.2.3.3.1 Aplicación de *T. harzianum*

En cada unidad experimental se colocó un total de 20 L de agua con las diferentes concentraciones, dependiendo del tratamiento 2 veces por semana, por un total de 4 semanas, con la ayuda de una bomba de asperjar de mochila.

3.2.3.3.2 Riego

El riego se realizó por un tiempo de 4 horas, con la ayuda de un aspersor 1/2" M Xcel Wobbler Tipo Bailarina #6. De esta manera se colocó una lámina de riego de 7 mm/semana en dos aplicaciones.

3.2.3.4 Diseño Experimental

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cuatro repeticiones para cada tratamiento y la prueba de separación de media Tukey al nivel de significancia 0,05

3.2.3.5 Variables

Después de 27 días de efectuar el trabajo en campo, se llevó a cabo la determinación el peso de la biomasa aérea, de raíces en materia seca, así como la altura de la planta y la incidencia y severidad de enfermedades, debido a que se quiso observar cómo el hongo actúa en la germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris* hasta el desarrollo de los primordios foliares.

3.2.3.5.1 Biomasa aérea

Se tomaron 16 plantas de fréjol ubicadas en el centro de la unidad experimental (parcela neta) de cada repetición de cada tratamiento, para lo cual se utilizó un microondas, de la siguiente manera: toda biomasa aérea se colocó en el microondas por 3 min para luego registrar el peso de la materia

seca, nuevamente se colocó la misma biomasa en el microondas por 1 min y se volvió a pesar, este procedimiento se repitió varias veces, hasta conseguir un peso constante.

3.2.3.5.2 Biomasa de raíces

Se tomaron sólo las raíces de las 16 plantas de fréjol ubicadas en el centro de la unidad experimental (parcela neta) de cada repetición de cada tratamiento, para lo cual se utilizó un microondas, de la siguiente manera: toda biomasa de raíces se colocó en el microondas por 3 min para luego registrar el peso de la materia seca, nuevamente se colocó la misma biomasa en el microondas por 1 min y se volvió a pesar, este procedimiento se repitió varias veces, hasta conseguir un peso constante.

3.2.3.5.3 Altura de planta

Cada planta de la parcela neta (16 plantas ubicadas en el centro de la unidad experimental) se midió con una regla la longitud desde el cuello de la raíz hasta el ápice caulinar.

3.2.3.5.4 Incidencia de enfermedades

La incidencia de enfermedades se obtiene por el porcentaje de especímenes enfermos en relación con el número total de ellos. Los individuos pueden ser plantas o partes de las mismas, en este caso.

La presencia o ausencia de enfermedad es analizada en cada individuo. Se emplea la fórmula:

$$\% I = \frac{\text{número de plantas enfermas}}{\text{total de plantas}} \times 100$$

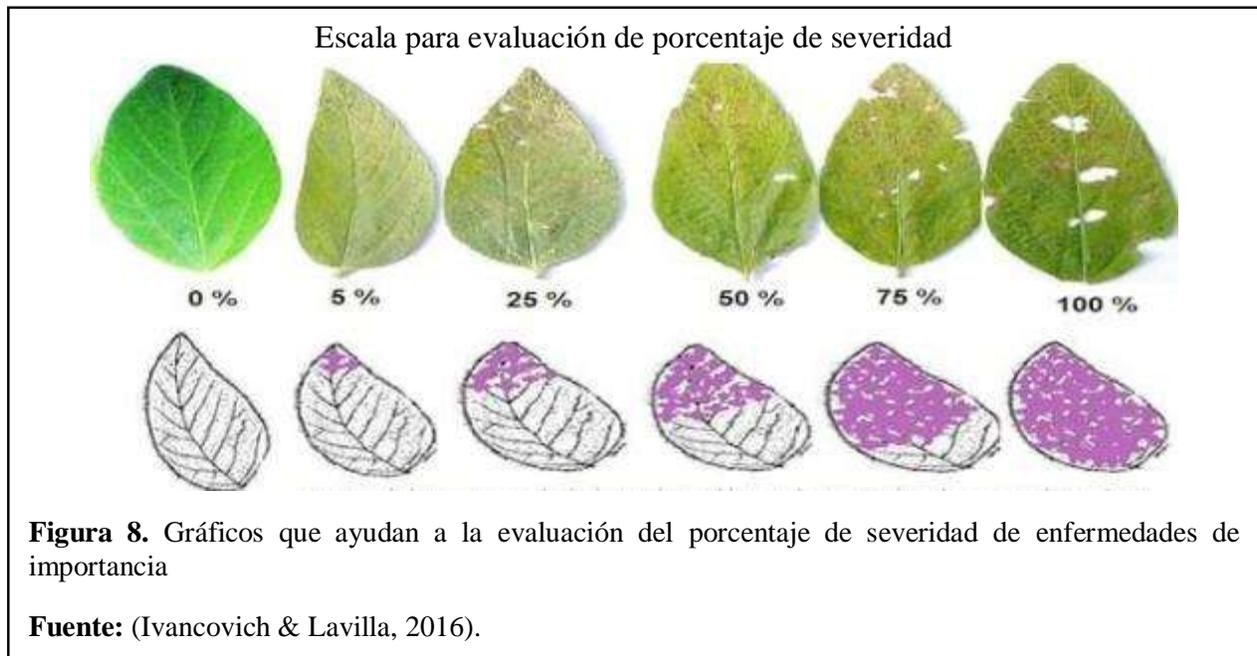
En donde:

I: Incidencia

3.2.3.5.5 Severidad de enfermedades

Es el porcentaje del área de tejido enfermo de la planta (frutos, hojas, tallos o raíces) perjudicado por la enfermedad, para eso se realiza una escala de 0 % a 100 % en donde se establece grados de

cuantificación de la enfermedad siendo 0 % sin presencia de la enfermedad y 100 % planta totalmente enferma, como se puede observar en la figura 8. En esta investigación se realizó un análisis a nivel foliar.



Capítulo IV

4. Resultados y discusión

4.1 Fase de laboratorio

La cepa utilizada en esta investigación creció aceleradamente en PDA, presentó gran cantidad de producción de esporas, las cuales revistieron toda el área del sustrato. Se observó una contextura ligera como polvo y un micelio aéreo blanco con pequeñas manchas verdes y planas.

4.1.1 Conteo de conidias

Los análisis de varianza no detectaron significancia estadística ($p > 0,05$) para la fuente de variación tratamientos para los días 7 y 14; pero diferencias significativas ($p < 0,001$) para la fuente de variación tratamientos para los días 21 y 28.

La tabla 6 resume los rangos definidos por la prueba de separación de medias Tukey a un nivel de significancia del 5 %.

Tabla 6

Rangos definidos por la prueba de Tukey al 5 %

Trat.	Descrip.	Conteo 7 días		Conteo 14 días		Conteo 21 días		Conteo 28 días	
		Rango	Prom. (ufc/mL)	Rango	Prom. (ufc/mL)	Rango	Prom. (ufc/mL)	Rango	Prom. (ufc/mL)
S2	Maíz	A	$1,62 \times 10^7$	A	$1,81 \times 10^7$	A	$3,22 \times 10^7$	A	$3,2 \times 10^7$
S3	Ajo	A	$14,8 \times 10^7$	A	$1,72 \times 10^7$	A	$2,18 \times 10^7$	A B	$2,49 \times 10^7$
S1	Arroz	A	$1,12 \times 10^7$	A	$1,33 \times 10^7$	B	$1,87 \times 10^7$	B C	$2,27 \times 10^7$
S4	Fréjol	A	$9,7 \times 10^6$	A	$1,3 \times 10^7$	B	$1,3 \times 10^7$	C D	$1,41 \times 10^7$
S5	Tomate	A	$9,5 \times 10^6$	A	$1,24 \times 10^7$	B	$1,16 \times 10^7$	D	$7,8 \times 10^7$

Elaborado por: Las autoras, 2020.

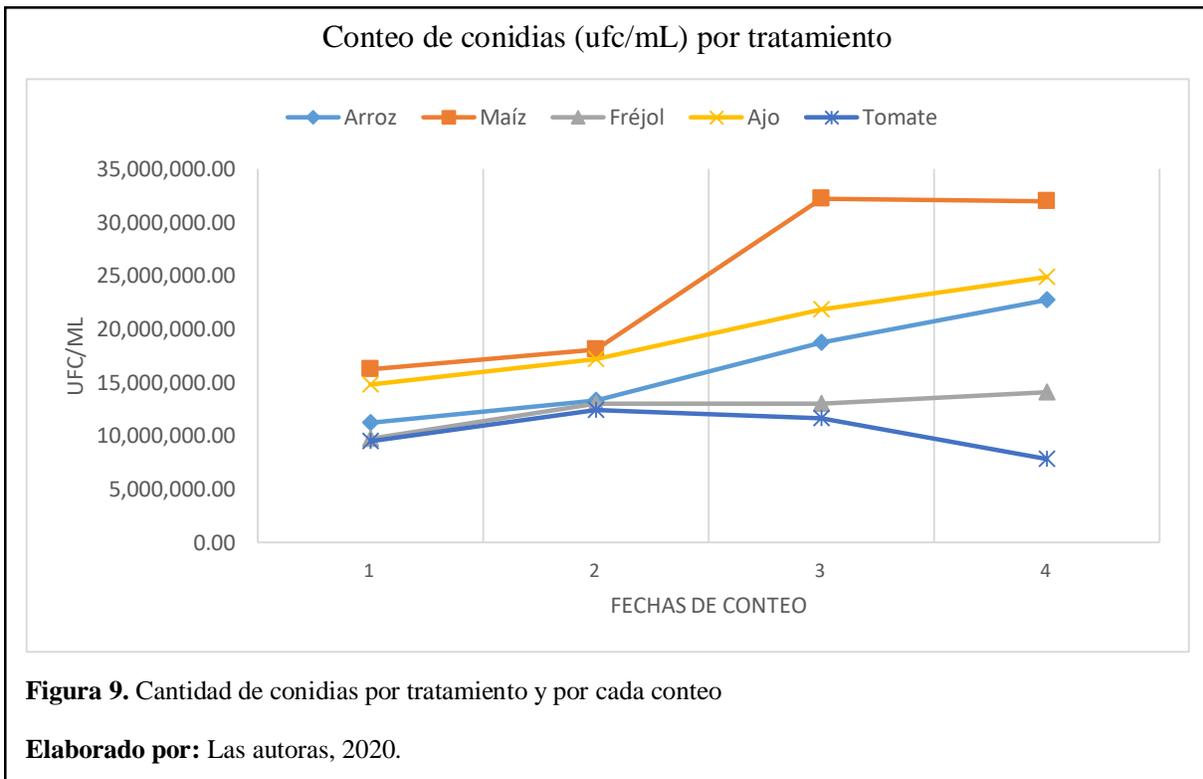
Los resultados muestran que los diferentes tratamientos no muestran diferencias para conteo de conidias las dos primeras semanas, pero a los 21 y 28 días *T. harzianum* se desarrolló mejor en la bráctea de maíz seguido de la catáfila de ajo, siendo los mejores resultados. El arroz que es uno de los sustratos más utilizados, comparte el rango B con el fréjol y tomate a los 21 días y a los 28 días comparte el rango B con el ajo, pero también el rango C con el fréjol.

Definitivamente el sustrato correspondiente a tomate, es el de peor comportamiento para esta variable, ya que las condiciones no fueron favorables para la producción de conidias como por ejemplo la falta de humedad, ya que con el pasar de los días se evidenció que el material vegetal dentro de las botellas se deshidratava y disminuía la cantidad de sustrato, por ende, nutrientes y área para que el hongo se desarrollara se fueron limitando cada semana provocando menor producción.

Se pudo observar el apareamiento de una tonalidad verde esmeralda intensa en los tratamientos a base de bráctea de maíz y catáfila de ajo, lo que según en un estudio realizado por Poalacín Cabascango (2015), significa una mayor concentración de conidias, en relación a las que presentan menor intensidad. Mientras más verde se presente la muestra, mayor será la cantidad de unidades formadoras de colonias, teniendo en cuenta que la intensidad del color está directamente relacionada con la presencia de conidias, tal como se observó el presente estudio.

Un estudio realizado por Nugra (2018) menciona que la hoja de maíz fue el tercer sustrato con mayor producción de conidias (ufc/mL) al octavo día; así también en un estudio realizado por Michel Aceves, et al. (2008) en donde evalúan quince sustratos orgánicos como cáscara de tomate, ajo, arroz, olote de maíz, etc., en donde el olote presentó la mejor concentración con $4,43 \times 10^8$ ufc/mL.

En la mayoría de estudios como el realizado por Poalacín Cabascango (2015) se aprecia que el máximo crecimiento se obtuvo a los 12 días de incubación. En esta investigación se quiso comprobar la durabilidad del sustrato hablando en términos nutricionales para el hongo, por ese motivo el último conteo se lo realizó a los 28 días como se observa en la tabla 6, dando como resultado que, en el arroz, la catáfila de ajo y el fréjol, la concentración de conidias fue creciendo con el tiempo, mientras que en las brácteas de maíz ligeramente se atenúo y el tomate, disminuyó.



También hay que acotar que ningún sustrato hasta el último día de conteo tuvo mal olor o señales de que se encontraban en descomposición.

Guilcapi (2016) señala que “los resultados difieren por el tipo de sustrato empleado, factores ambientales y contenido nutricional de los sustratos” (pág. 36), además Sandle (2014) acota que

“*T. harzianum* es un hongo metabólicamente versátil, capaz de utilizar un amplio rango de biomasa vegetal incluyendo oligosacáridos y polisacáridos” (págs. 644-646).

Michel-Aceves, et al. (2008) afirma que “*T. harzianum* tiene una buena producción en aquellos sustratos orgánicos que tienen alto porcentaje de humedad, bajo contenido de minerales, proteína y grasa, y un porcentaje intermedio de fibra” (pág. 56).

Según La Grange, Den Haan, & Van Zyl (2010) afirman que “*T. harzianum* es capaz de utilizar y degradar residuos lignocelulósicos que están constituidos de celulosa (40-55 %), hemicelulosa (25-50 %), y lignina (10-40 %)” (págs. 1195-1208); como se constata con las brácteas de maíz que presentan lignina 23 % y celulosa 43,14 % (Hurter, 1997). Por otra parte se conoce que elementos como grasas, vitaminas y sales son necesarios para el desarrollo de *Trichoderma* sólo en pequeños aportes (Papavizas, 1985), es así que el ajo por cada 100 g posee 1,235 mg de vitamina B6 y de grasa posee 0,5 g (Delgado-Olivares, Betanzos, & Sumaya, 2010).

Hay que indicar que para obtener un óptimo crecimiento del hongo se debe tener un sustrato con un porcentaje de humedad que debe oscilar entre 30–85 % tal como lo menciona (Raimbault, 1998), entonces como se presenta en la tabla 3, los sustratos a base de brácteas de maíz y catáfila de ajo poseen ese rango de humedad necesario, relacionándose así con la mayor producción de conidias. La transmisión y asimilación de los nutrientes, así como la degradación del sustrato son factores limitados por un contenido de humedad bajo, dando como resultado un bajo crecimiento microbiano. Un alto valor de humedad en el medio sólido reduce su porosidad, lo que entorpece la transferencia de oxígeno. Por tanto, es oportuno encontrar el grado de humedad recomendado para optimizar el crecimiento de microorganismos y así adquirir un mayor rendimiento de metabolitos (enzimas, ácidos orgánicos, etc.) (Jiménez Monte & Pantoja Ponce, 2012).

En la figura 9, se visualizan en orden descendente la cantidad de conidias por tratamientos. Se puede deducir que los bajos datos del tomate se deben a una menor superficie de contacto con el hongo a diferencia de una bráctea de maíz que es más rígida y gruesa como se puede evidenciar en un estudio de Michel Aceves, et al. (2005).

4.1.2 Viabilidad de conidias

Esta variable fue determinada a las cuatro semanas de crecimiento (28 días) para la cual el Análisis de varianza detectó significancia estadística ($p < 0,01$) para la fuente de variación tratamientos.

La tabla 7 resume los rangos definidos por la prueba de separación de medias Tukey a un nivel de significancia del 5 %

Tabla 7

Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para la viabilidad de conidias, en porcentaje por tratamientos

Tratamientos	Medias	N	Rango	
	% de viabilidad			
Maíz	87, 81	5	A	
Ajo	87, 18	5	A	
Arroz	82, 64	5	B	
Fréjol	81, 16	5	B	C
Tomate	79, 69	5	C	

Elaborado por: Las autoras, 2020.

La prueba de separación de medias (tabla 7) ubica a los tratamientos brácteas de maíz y catáfila de ajo en el rango “A”, resultado que resulta interesante si se lo analiza junto con la variable anterior, número de conidias, ya que muestra la supremacía de estos dos tratamientos.

En un estudio realizado por Michel-Aceves, et al. (2008), se observa que la catáfila de ajo obtuvo un 87,8 % de viabilidad, mientras que el valor obtenido en la presente investigación fue de 87,18 %; siendo valores que presentan alta similitud.

En todos los tratamientos la germinación de conidias de *T. harzianum* se encuentra entre un 79,69 % a 87,81 %, lo que según Michel-Aceves, et al. (2008), significa que a pesar del olor intenso de la catáfila de ajo, no existió un sustrato que fue afectado desfavorablemente en la germinación de conidias.

4.2 Fase campo

Es importante considerar la concentración de conidias utilizada para el control biológico, cuanto más alta sea, mejor será el resultado.

4.2.1 Biomasa de la parte aérea

El desarrollo de la biomasa aérea está relacionado con la humedad del suelo y una serie de procesos bioquímicos y biofísicos, además estos procesos se ven afectados por las condiciones ambientales (Krisek, Carmi, Mirecki, Snyder, & Bunce, 1985).

En campo se presentaron condiciones ambientales que afectaron al cultivo, como la falta de humedad y la intensa exposición de luz solar, que en los meses que se desarrolló esta investigación se intensificaron; esto pudo haber influenciado en procesos fisiológicos que afectaron al desarrollo aéreo de la planta y en la susceptibilidad a organismos patógenos.

Según el análisis de varianza, la aplicación de *T. harzianum* no influyó significativamente en la biomasa aérea de *Phaseolus vulgaris* después de cuatro semanas de crecimiento, aunque las medias (tabla 8) dejan ver que los tratamientos T3 y T2 que poseen *T. harzianum* son mejores que el tratamiento testigo T1.

Tabla 8

Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para la variable Biomasa de parte aérea

Tratamiento	Medias		
	g/parcela neta (16 plantas)	N	Rango
T3	21,75	4	A
T2	21,25	4	A
T1	18,50	4	A

Elaborado por: Las autoras, 2020.

4.2.2 Biomasa de raíces

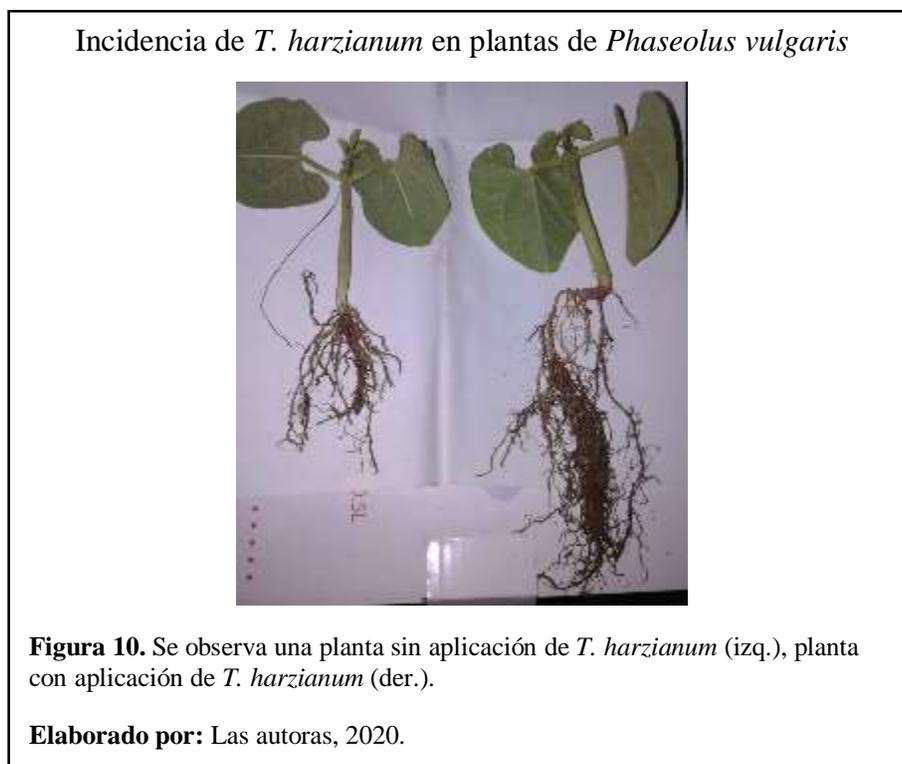
Como lo asegura Maya (2015), “*T. harzianum* protege las raíces permitiéndoles crecer más fuertes y abundantes, dándoles un sistema radicular más sano confiriéndole a la planta resistencia a enfermedades causadas por *Phytium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*” (pág. 1), aseveración que se presenta en los resultados de este estudio. Por tanto, el análisis de varianza pudo detectar significancia estadística para tratamientos ($p<0,01$). La prueba de separación de medias (tabla 9) corrobora que *T. harzianum* sí influye en el buen desarrollo de las raíces (figura 10), ubicando a los tratamientos T3 y T2 en el rango “A” como los mejores y el tratamiento T1 en el rango “B”, con el peor resultado para la variable análisis.

Tabla 9

Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para la variable Biomasa de raíces

Tratamiento	Medias		Rango
	g/parcela neta (16 plantas)	N	
T3	6,25	4	A
T2	5,75	4	A
T1	2,75	4	B

Elaborado por: Las autoras, 2020.



Trichoderma interviene en la conversión de varias proteínas que se encuentran en el medio, así como en la degradación del humus y lignina, que al estar formadas por estructuras con núcleos aromáticos degradan sus cadenas laterales por reacciones de oxidación. También participa en la

biotransformación de moléculas como la celulosa y hemicelulosa durante el proceso de mineralización del nitrógeno. El proceso biológico de digestión que realiza *Trichoderma* muestra como resultado una favorable expresión fenotípica como por ejemplo la germinación de semillas, buen desarrollo de la planta y sus raíces (Endara, 2011).

Los estudios de Van Noordwijk & Willigen (1987) sobre la correlación entre raíces y partes aéreas (biomasa de raíces/ biomasa aérea) han demostrado que existe una interdependencia entre el sistema radicular y las partes aéreas de las plantas, y enfatizan la importancia del equilibrio funcional entre estas dos partes. Russell (1977) señaló que cuando las condiciones ambientales para el crecimiento de las plantas no están restringidas, existe una relación logarítmica entre el crecimiento de las raíces y las partes aéreas durante la etapa de crecimiento vegetativo. Por otro lado, raíces cortas y con poca extensión puede explorar menos suelo en busca de agua y nutrientes. Si la longitud de la raíz o la densidad de la raíz por unidad de volumen de suelo es baja, es necesario que se mantenga una tasa de absorción de nutrientes y agua más alta de lo normal para así satisfacer la demanda (Bennie, 1991).

Así también, las altas temperaturas afectan la capacidad de la leguminosa para absorber la humedad del suelo y los fuertes vientos aumentan el deterioro de las plantas (Schwartz & Gálvez, 1980), por lo que contribuyen a que el suelo se compacte y dañen el sistema radicular. Estas condiciones ambientales se presentaron cuando se desarrolló la presente investigación y se deduce que afectaron considerablemente al cultivo.

4.2.3 Altura de planta

La diferencia en la cantidad de raíces de los tratamientos T2 y T3 en relación al tratamiento testigo T1, se ven también evidenciada en la altura de planta. El análisis de varianza detecta significancia

estadística ($p < 0,05$) para la fuente de variación tratamientos. Según la prueba de separación de media, los tratamientos T3 y T2 siguen mejores que el tratamiento testigo T1, como se observa en la tabla 10, a pesar de que el tratamiento T2 comparta el rango “B” con el tratamiento T1.

Tabla 10

Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para la variable Altura de planta

Tratamiento	Medias cm de la planta	N	Rango
T3	8,10	4	A
T2	7,96	4	A B
T1	7,19	4	B

Elaborado por: Las autoras, 2020.

En un estudio realizado por Carro (2019), muestra que la biomasa aérea está sobreestimada, considerando que la variación en la altura del dosel contribuye a las toneladas por hectárea de un bosque, menciona que incluir éste parámetro mejora la estimación sobre todo a nivel de parcela, así también menciona que existe un consenso entre diferentes autores en que el aporte del dato de la altura para la biomasa aérea, es una variable que proporciona mayor exactitud en su cálculo.

Por lo tanto se espera que entre la biomasa de las raíces, partes aéreas y la altura de la planta haya un equilibrio dado que la acumulación de biomasa (área y raíces) y la altura de la planta son características que van a depender del ambiente y la interacción que existe con el hongo *Trichoderma harzianum*, por consiguiente la proporción de biomasa aérea y de raíces va a ser proporcional al crecimiento en altura de la planta presentando una correlación positiva, tal como se pudo observar en los tratamientos con *T. harzianum*.

4.2.4 Incidencia de enfermedades

T. harzianum ejerce biocontrol de varias formas: a) por competencia ya sea de sus nutrientes y/o el espacio, mediante antibiosis (producción de metabolitos), o cambiando las condiciones ambientales, y b) mediante parasitismo (Benítez, Rincón, Limón, & Codón, 2004); aunque cada vez hay más estudios dedicados a estudiar la característica antibacteriana de *Trichoderma* spp. “*in vitro*”, la comprensión sobre el mecanismo exacto que reduce la incidencia de enfermedades tras la aplicación de *Trichoderma* spp., es aún insuficiente.

De forma coherente con lo mencionado en el párrafo anterior, el ADEVA para variable en análisis detectó alta significancia estadística ($p < 0,01$) para la fuente de variación tratamientos, ubicando la prueba de separación a los tratamientos con presencia de *Trichoderma* T2 y T3 en el rango “A”, con menor incidencia.

Tabla 11

Test de Tukey ($\alpha=0,05$) para Incidencia de enfermedades

Tratamiento	Medias	N	Rango
	% de incidencia de enfermedades		
T2	18,75	4	A
T3	18,75	4	A
T1	35,94	4	B

Elaborado por: Las autoras, 2020.

El tratamiento sin aplicación de *T. harzianum* presentó la mayor cantidad de plantas enfermas a partir de la muestra total, como lo muestra la tabla 11, indudablemente eso no pasa en las plantas

con aplicación del hongo debido a todas las propiedades biocontroladoras antes mencionadas de *T. harzianum*.

Hay que destacar que *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas syringae*, son las enfermedades que se presumen influyeron en los bajos datos obtenidos de la altura de *Phaseolus vulgaris*, así como para el buen desarrollo de hojas y raíces.

4.2.5 Severidad de enfermedades

T. harzianum presenta su habilidad antagonista de forma muy versátil, dependiendo de la especificidad de la cepa y su manera de actuar, tales como lo son la competencia, antibiosis, neutralización de enzimas de los patógenos, micoparasitismo, etc. (Martínez, Infante, & Reyes, 2013).

Martínez, Infante, & Reyes (2013) mencionaron que estudiar estos modos de acción en condiciones de campo es muy complicado, ya que *Trichoderma* es un hongo que habita el suelo, y en su mayoría estos procesos ocurren en la rizósfera como se evidenció en la presente investigación ya que las enfermedades se presentaron a nivel foliar a diferencia de las raíces que presentaron características favorables con la aplicación del hongo.

Sin embargo, Martínez, Infante, & Reyes (2013) también mencionan que *T. harzianum* sí puede ser capaz de atacar patógenos aéreos y a nivel de hojas, pero para ello es esencial el uso de adherentes compatibles con el hongo. Por ejemplo, en varios estudios se evidenció que cuando se aplica *T. harzianum* en el aire en dosis de 5 y 10 kg/ha, se redujo la incidencia de marchitez de *Rhizoctonia solani* en plantas de arroz, mientras que con aplicaciones de *T. viride* y *T. harzianum* en el follaje cada 14 días, se disminuyó la severidad e intensidad de moniliasis en cacao; así que

encontrando adherentes adecuados se podría tratar las enfermedades presentes en *Phaseolus vulgaris* de la presente investigación.

En este sentido el comportamiento de los tratamientos para severidad es muy similar al de la incidencia. El análisis de varianza detectó alta significancia estadística ($p < 0,01$) para la fuente de variabilidad tratamientos y la prueba de separación de media ubica los tratamientos con *Trichoderma* T2 y T3 en el rango “A” con la menor incidencia y al tratamiento sin *Trichoderma* T1 en el rango “B” (tabla 12).

Tabla 12

Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) para Severidad de las plantas enfermas

Tratamiento	Medias % de severidad	N	Rango
T1	42,96	4	A
T3	21,09	4	B
T2	20,57	4	B

Elaborado por: Las autoras, 2020.

5. Conclusiones

- Se evaluaron cinco sustratos generados a partir de la actividad agrícola de la ASOCAMCAY: ajo (catáfila externa), fréjol (vaina), maíz (bráctea protectora de la mazorca), tomate (epicarpio) y arroz (grano entero), siendo este último el testigo y el más utilizado en la mayoría de estudios para la masificación de conidias de *T. harzianum*.
- *T. harzianum* se desarrolló mejor en los sustratos orgánicos: bráctea de maíz con $3,2 \times 10^7$ ufc/mL y catáfila de ajo con $2,49 \times 10^7$ ufc/mL produciendo la mayor cantidad de conidias de los cinco tratamientos probados. Así mismo coinciden con el mayor porcentaje de viabilidad de conidias con un 87,81 % y 87,18 % respectivamente, aunque los otros sustratos también mostraron buena producción de conidias y viabilidad de las mismas.
- Gracias a las aplicaciones del hongo en dos concentraciones (1×10^8 y 1×10^{10} ufc/mL) en campo desde la siembra de semillas de *Phaseolus vulgaris* hasta cuatro semanas de desarrollo de las plantas, se comprobó la acción biocontroladora, bioestimulante y biofortificante mediante análisis de variables como altura de planta, biomasa aérea de raíces, así como incidencia y severidad de enfermedades en donde *T. harzianum* influyó positivamente en todas ellas.

6. Recomendaciones

- Usar las brácteas que recubren la inflorescencia femenina del maíz para la producción de *Trichoderma harzianum* al ser utilizado como biocontrolador en el ámbito de la Asociación de productoras Agroecológicas La Campesina de Cayambe (ASOCAMCAY).
- Evaluar otros sustratos orgánicos provenientes de residuos agroindustriales ya que se evidenció en esta investigación los beneficios nutricionales, de producción y de costos, demostrando que la mayoría de residuos generados en ese ámbito son viables y que se podrían utilizar a gran escala en la industria agroecológica.

7. Bibliografía

- Agrios, G. N. (2005). *Fitopatología*. México: Limusa.
- Andrade, C. (2012). *Evaluación del efecto de la aplicación de Trichoderma harzianum y Trichoderma viride para el control de marchitez en mora de castilla (Rubus glaucus Benth) en el cantón Píllaro, provincia de Tungurahua*. Riobamba. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2207/1/13T0752%20.pdf>
- Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., & Peña-Cabriales, J. (2009). *El género fúngico Trichoderma y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental.
- Arias, A. (2010). *Microorganismos eficientes y su beneficio para la agricultura y el medio ambiente*. Journal de ciencia e ingeniería.
- Ashok, A., Doriya, K., Rao, D., & Kumar, D. (2017). *Diseño de un biorreactor de estado sólido para aplicaciones industriales: una visión general de los biorreactores convencionales*. Biocatálisis y Biotecnología Agrícola.
- Barahona, C., & Rivera, M. (2006). *Obtención de indicadores de ácido-base a partir de cáscara de Phaseolus vulgaris (fríjol negro)*. Obtenido de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4986/1/10131792.pdf>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. (2004). *Mecanismo de biocontrol de las cepas de Trichoderma*. Microbiología Internacional 7.
- Bennie, A. (1991). Groth e impedancia mecánica. En Y. Waisel, A. Eshel, & U. Kafkafi, *La raíz de las plantas: la mitad escondida* (págs. 343-416). New York-USA: Marcel Dekker.

- Camacho, F., & Salgado, A. (2019). *Fabricación de aglomerados biodegradables utilizando vaina de fríjol (*Phaseolus vulgaris*) y almidón de yuca (*Manihot esculenta*)*. Obtenido de <https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/3394/1/PROYECTO%20GRADO%20CORRECCIONES%202020.pdf>
- Campaña, A., Nieto, C., Barrera, A., & Isch, E. (2011). *Contaminación de las aguas y políticas para enfrentarlas*. Foro de los Recursos Hídricos, Quito. Obtenido de <http://www.camaren.org/documents/contaminacion.pdf>
- Carmona, I. (Agosto de 2013). *Acerca de: Agrimundo*. Obtenido de Utilización de los residuos de la industria del tomate para la obtención de compuestos bioactivos: http://nutriciondebovinos.com.ar/MD_upload/nutriciondebovinos_com_ar/Archivos/TOMATE_RESIDUOS_BIOACTIVOS.pdf
- Carro, M. (12 de Mayo de 2019). *Cálculos de biomasa en las parcelas permanentes con y sin altura del árbol: ¿Es necesario incluir esta variable en Yungas?* Obtenido de <https://ier.conicet.gov.ar/calculos-de-biomasa-yungas/>
- Casas, E., Faraldi, M., & Bildstein, M. (2008). *Manual de Compuestos Bioactivos a partir de residuos del procesado del tomate*. Obtenido de Proyecto Bioactive-net - Acción Específica de Apoyo de Comisión Europea: http://nutriciondebovinos.com.ar/MD_upload/nutriciondebovinos_com_ar/Archivos/TOMATE_TECNICAS_INDUSTRIAL_PARA_EXTRAER_SUBPROD._CONSUMO_HUMANO-COSMETICA.pdf
- Castro, R. (2015). *Bioproducto a base de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* Rifai para el manejo de la *Sigatoka negra* (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet)*.

- Chilon, E. (2017). Revolución Verde, Agricultura y Suelos, Aportes y Controversias. *Apthapi* 3(3), 844-859. Obtenido de <http://ojs.agro.umsa.bo/index.php/ATP/issue/view/27>
- Cooney, J. M., Lauren, D. R., Jensen, D. J., & Perry-Meyer, L. J. (1997). *Efecto del sustrato sólido, el suplemento líquido y el tiempo de cosecha en la producción de 6-n-pentilo-2h-pirano-2-uno (6PAP) por Trichoderma spp.* Journal de química en agricultura y alimentos.
- Crozier, J., Arroyo, C., Morales, H., Melnick, R. L., Strem, M. D., Vinyard, B. T., & Bailey, B. A. (2015). *La influencia de la formulación en la actividad biológica de Trichoderma y el manejo de la podredumbre helada en Theobroma cacao.* Patología de Plantas.
- de Jesús, S., Moreira, N., & Maciel, F. (2017). Hidrodinámica y transferencia de masa en los biorreactores de columna de burbujas de transporte aéreo convencional, de transporte aéreo revuelto y de tanque revuelto, utilizando fluido viscoso: un estudio comparativo. *Biochemical Engineering Journal*, 70-81.
- Delgado-Olivares, L., Betanzos, G., & Sumaya, M. T. (2010). *Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés MT oxidativo.* Investigación y Ciencia.
- Deshpande, M. V. (1999). Producción de micopesticidas por fermentación: potencial y desafíos. *Crit Rev Microbiol*.
- Diez. (2010). *Bases agronómicas para la utilización de restos agrarios en la biodesinfección de suelos.* Tesis doctoral.: Universidad Politécnica de Madrid. 605 p.
- Diorio, L. A., Forchiassin, F., Papinutti, V. L., & Sueldo, D. V. (2003). *Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por Saccobolus saccoboloides (Fungi, Ascomycotina).* Revista Iberoamericana de Micología.

- Djonovic, S., Kolomiets, M. V., Vargas, W. A., Horndeski, M., Wiest, A., & Kenerley, C. M. (2007). *Para inducir la resistencia sistémica en el maíz se necesita un elicitador proteínico Sm1 del hongo benéfico Trichoderma virens*. Fisiología de plantas.
- Elósegui, O. (2006). Métodos artesanales de Producción de Biopláguidas a partir de Hongos Entomopatógenos y Antagonistas. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
- EmelNorte. (Noviembre de 2015). *Empresa Eléctrica Regional del Norte S. A.* Obtenido de Estudios de Diseño de la Subestación Cananvalle: www.compraspublicas.gob.ec/compras/bajararchivo
- Endara, M. A. (2011). *Reproducción del hongo Trichoderma harzianum (Biofungicida) aprovechando desechos agroindustriales (residuos de papa, tamo de fréjol, bagazo de caña)*. Sangolquí-Ecuador: (Tesis Pregrado)(Universidad del Norte-Escuela de Ingeniería Agroindustrial).
- Escobar, G. (2016). La relevancia de la agricultura en América Latina y el Caribe. *Nueva Sociedad-Fundación Friedrich Ebert*.
- FAO. (2004). *El Arroz y la situación humana*. Obtenido de <http://www.fao.org/rice2004/es/f-sheet/hoja3.pdf>
- FAO. (2020). *Food an Agriculture Organization of the United Nations*. Obtenido de FAOSTAT: Plaguicidas Uso: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/RP>
- FAO. (2020). *SOFI 2020*. Obtenido de El Estado de Seguridad Alimentaria y Nutrición en el Mundo 2020: http://www.fao.org/3/ca9692en/online/ca9692en.html#chapter-1_1

Fernández, A., & Sánchez, E. (2017). Estudio de las propiedades fisicoquímicas y calidad nutricional en distintas variedades de frijol consumidas en México. *Nova Scientia*, 133-148. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/2033/203350918008.pdf>

Fravel, D. R. (2005). *Comercialización e implementación de biocontrol*. Obtenido de Annu Rev Fitopatología: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>

Google Earth. (2020). Obtenido de <https://earth.google.com/web/search/0%20%2728.7%22N+78%20%2712.5W/@0.02507045,-78.20305255,2773.77700653a,504.36653443d,35y,10.91200001h,0t,0r/data=CigiJgokCd2rt1WjXTNAEd2rt1WjXTPAGTO3SMhvGIPAITBQTyiQGwbA>

Granda, D., Mejía, A., & Jimenez, G. (2005). Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*. Vol. 12, 13-20.

Guilcapi, V. (2016). *Determinación de la estabilidad y viabilidad de Trichoderma harzianum Rifai en cinco sustratos usados para la elaboración de un biofungicida en formulación líquida*. Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4956/1/236T0203.pdf>

Gupta, V., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Druzhinina, I., & Tuohy, M. (2014). *Biotecnología y biología del Trichoderma*. Galway-Irlanda: Elsevier.

- Hernández-Melchor, D., Ferrera-Cerrato, R., & Alárcón, A. (2019). *Trichoderma: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial*. México: Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences.
- Hjeljord, L., & Tronsmo, A. (1998). El Trichoderma y el Gliocladium en el control biológico: una visión general. En G. Harman, & C. Kubicek, *Trichoderma & Gliocladium* (págs. 131-151). Volumen 2. Enzimas, control biológico y aplicaciones comerciales.
- Hohmann, P., Jones, E. E., Hill, R. A., & Stewart, A. (2011). *Comprensión de la Trichoderma en el sistema radicular del Pinus radiata: asociaciones entre la colonización de la rizosfera y la promoción del crecimiento de las plántulas comerciales*. UK: Biología de hongos.
- Hoog, G. S., Guarro, J., Gene, J., & Figueras, M. J. (2000). *Atlas de hongos clínicos*. Netherland: CBS Utrece y the Netherland.
- Howell, C. (2003). *Mecanismos empleados por las especies de Trichoderma en la lucha biológica contra las enfermedades de las plantas: La historia y la evolución de los conceptos actuales*. Enfermedades vegetales.
- Huerta, K. K., & Martínez, A. L. (2018). La revolución verde. *Revista Iberoamericana de Bieconomía y Cambio Climático Vol. 4 N° 8*, 1040-1052.
- Hurter, W. (1997). *Usos de la fibra de plantas no madereras en la fabricación de papel*. Hurter Consult Incorporated. Residuos agrícolas.
- Idris, A. S., Pandey, A., Rao, S., & Sukumaran, R. K. (2017). *Producción de celulasa a través de la fermentación de la bandeja de estado sólido, y su uso para el bioetanol a partir del sorgo*. Tecnología de Biorrecursos.

INEC. (2013). *Módulo Ambiental Uso de Plaguicidas en la Agricultura*. DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES.

Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal*.

INIAP. (2003). Estación Experimental Santa Catalina. *PRONALEG - G.A.; INIAP 420 Canario del Chota*.

Ivancovich, A., & Lavilla, M. Á. (2016). *Propuestas de escalas para la evaluación, a campo y en laboratorio, del tizón foliar y la mancha púrpura de la semilla, causadas por Cercopora kikuchii, en soja*. Engormix Agricultura.

Jiménez Monte, P. E., & Pantoja Ponce, V. E. (2012). *Diseño y construcción de un fermentador rotatorio de fase sólida para la multiplicación del hongo Trichoderma sp.* Riobamba-Ecuador: Tesis Ingeniería Química, Universidad Superior Politécnica de Chimborazo.

Krissek, D. T., Carmi, A., Mirecki, R. M., Snyder, F. W., & Bunce, J. A. (1985). *Efectos comparativos del estrés por humedad del suelo y el volumen restringido de la zona radicular en las respuestas morfogénicas y fisiológicas de la soja (Glycine max (L.) Merr)*. Exp. Bot.

Kumar, S., Thaku, M., & Rani, A. (2014). *Trichoderma: Producción en masa, formulación, control de calidad, entrega y su alcance en la comercialización en la India para la gestión de las enfermedades de las plantas*. African Journal of Agricultural Research.

La Grange, D. C., Den Haan, R., & Van Zyl, W. H. (2010). *La ingeniería de la capacidad celulolítica en los organismos de bioprocesamiento*. Applied Microbiology and Biotechnology.

- López, T. (Enero de 2007). El ajo: Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *Elsevier*, 26, 79. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-el-ajo-13097334>
- Lorenzo, N. (2012). *Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de Trichoderma spp.* La Habana-Cuba: Tesis-Postgrado.
- Lorito, M. (2006). La biología molecular de las interacciones entre tricotermos, hongos fitopatógenos y plantas: Oportunidades para desarrollar nuevos métodos de control de enfermedades. En *Memorias del Taller Latinoamericano Biocontrol de Fitopatógenos con Trichoderma y Otros Antagonistas* (págs. 28-31). La Habana.
- Marques, S., Matos, C. T., Gírio, F. M., Roseiro, J. C., & Santos, J. A. (2017). *Producción de ácido láctico a partir de lodo de papel reciclado: Intensificación del proceso mediante la introducción de un lote de alimentación en un biorreactor de reciclaje de membranas.* *Biochemical Engineering Journal*.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos.* Cuba: *Rev. Protección Veg.* Vol. 28.
- Martínez-Medina, A., Roldán, A., Lloret, E., & Pascual, J. (2008). Formulación de *Trichoderma harzianum* rifai en la producción ecológica de plántulas de melón en semillero para el control de la fusariosis vascular. *VIII Congreso científico de SEAE "Agricultura y Alimentación Ecológica"* (págs. 1-10). Bullas-España: Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE).

- Maya, H. V. (2015). *Trichoderma harzianum*. Obtenido de EcuRed Conocimiento para todos: http://www.ecured.cu/index.php/Trichoderma_harzianum
- Michel, A., Otero, M., Martínez, R., Rodríguez, N., Ariza, R., & Barrios, A. (2008). *Producción masiva de Trichoderma harzianum Rifai en diferentes sustratos orgánicos*. México: Rev. Chapingo Ser.Hortic vol.14 no.2.
- Michel-Aceves, A. C., Reyes-De la Cruz, A., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O., & Lezama-Gutiérrez, R. (2005). *Trichoderma Pers.: Fr. spp., sobre Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Snyder y Hansen) y Sclerotium rolfsii (Sacc.) in vitro e Invernadero*. Revista Mexicana de Fitopatología.
- Nieto, M., Steyaert, J., Salazar, F., Vi Nguyen, D., Rostás, M., Braithwaite, M., . . . Ohkura, M. (9 de Febrero de 2017). *Condiciones ambientales de crecimiento de Trichoderma spp. Afecta los derivados del ácido acético indol, los compuestos orgánicos volátiles y la promoción del crecimiento de las plantas*. Obtenido de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00102/full>
- Nugra, A. (2018). *Evaluación de sustratos orgánicos para la propagación del Trichoderma spp*. Cuenca-Ecuador.
- Pandey, M., & Tewari, R. (1990). El antagonismo del Pleurotus sajor-caju por algunos hongos de la hierba. *Mushroom Journal*, 52-58.
- Papavizas, G. (1985). *Trichoderma y Gliocladium: biología, ecología y potencial de biocontrol*. Annu. Rev. Phytopathol. 23.
- Pasturas de América. (2016). *Acerca de: Pasturas de América*. Obtenido de Residuos del cultivo de maíz: <http://www.pasturasdeamerica.com/utilizacion-forrajes/residuos-agricolas/maiz/>

Pineda et al. (2015). Crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en residuos agroindustriales no suplementados. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Zulia*, Vol. 38.

Pineda-Insuasti, J., Benavides-Sotelo, E., Duarte-Trujillo, A., Burgos-Rada, C., Soto-Arroyave, C., Pineda-Soto, C., . . . Álvarez-Ramos, S. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*. Ciudad de La Habana, Cuba: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.

Poalacín Cabascango, J. M. (2015). *Estudio del adecuado crecimiento del hongo Trichoderma harzianum y Trichoderma hamatum en sustrato sólido*. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4776/1/T-UCE-0017-128.pdf>

Raimbault, M. (1998). *General y microbiológico del sustrato sólido*. Obtenido de Revista electrónica de biotecnología: <http://www.ejbiotechnology.info/indez.php/ejbiotechnoly/article/view/v1n3-9/799#49>

Ramos, E., Navarro, R., Zumaqué, L., & Violeth, J. (2008). *Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de Trichoderma sp*. *Revista Colombiana de Biotecnología*.

Rifai, M. A. (1969). *Una revisión del género Trichoderma*. 1-56: *Mycological Papers*.

Romero, O., Huerta, M., Huato, M. Á., Dominguez, F., & Arellano, D. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Colombiana de Biotecnología*, 146. Obtenido de file:///C:/Users/intel/Downloads/Dialnet- CaracteristicasDeTrichodermaHarzianumComoAgenteLim-3105406.pdf

- Russell, R. (1977). *Sistema de raíces de la planta: Su función e interacción con el suelo*. Berkshire-UK: McGraw-Hill Book.
- Samuels, e. a. (2006). *Especies agregadas-Trichoderma koningii*. EEUU: Estudios de micología n° 56.
- Sandle, T. (2014). Trichoderma. En C. A. Batt, & M. L. Tortorello, *Encyclopedia of Food Microbiology* (págs. 644-646). London-UK.
- Sarandón, S., & Flores, C. (2014). *Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables* (Primera ed.). Argentina: Editorial de la Universidad de la Plata.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Bio-Tecnología*, 14-16.
- Schwartz, H., & Gálvez, G. (1980). *Problemas de producción del fríjol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de Phaseolus vulgaris*. Cali-Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Seaby, D. (1996). Investigación de la epidemiología del moho verde del hongo (*Agaricus bisporus*) de abono causado por *Trichoderma harzianum*.
- Sharma, V., Salwan, R., & Sharma, P. (2017). *Los aspectos mecanicistas comparativos de la trichodermia y los probióticos: posibilidades de investigación futura*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.
- Sivila, N., & Álvarez Jujuy, S. (2013). *Producción de Trichoderma*. Obtenido de <http://www.cedaf.fca.unju.edu.ar/assets/manual-de-trichoderma-2013---sivila-alvarez.pdf>

- Subramaniam, R., & Vimala, R. (2012). *Fermentación en estado sólido y sumergido para la producción de sustancias bioactivas: un estudio comparativo*. International Journal of Security and Networks.
- Tipán, V. (2016). *Evaluación del crecimiento del hongo Pleurotus ostreatus con el uso de un sustrato de rastrojo de maíz con composición variable de papel*. Obtenido de <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/16617/1/CD-7248.pdf>
- Torres, A. (2017). *Manual de cultivo del tomate al aire libre*. Obtenido de <https://www.inia.cl/wp-content/uploads/ManualesdeProduccion/11%20Manual%20Tomate%20Aire%20Libre.pdf>
- Torres-De la Cruz, M., Ortiz-García, C., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J., Ávalos-Contreras, N., & Capello-García, S. (2015). *Diversidad de Trichoderma en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México*. Tabasco: Revista Mexicana de Biodiversidad.
- Troya, C., & Vaca Granda, L. (2014). *Protocolo para la reproducción de cepas nativas de Trichoderma spp. en laboratorios artesanales*. Ecuador: Proyecto de Innovación Tecnológica Participativa y Productividad Agrícola. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.
- Ulloa, J., Ulloa, P., Ramírez, J., & Ulloa, B. (Septiembre de 2011). *El frijol (Phaseolus vulgaris): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos*. Obtenido de <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-08/1.pdf>
- UVIGO. (s.f.). *Manual Básico de Agricultura Ecológica*. Obtenido de http://www.cienciasmarinas.uvigo.es/bibliografia_ambiental/agricultura_ecologica/Manual%20Agricultura%20Ecologica.pdf

Van Noordwijk, M., & Willigen, P. (1987). *Los conceptos agrícolas de raíces: desde el equilibrio morfo genético hasta el funcional crecimiento entre raíces y los brotes*. 487-496: Neth. J. Agri. Sci.

Vargas, Y., & Pérez, L. (2018). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente*. Obtenido de file:///C:/Users/intel/Downloads/3108-Texto%20del%20art%C3%ADculo-13312-2-10-20190408%20(1).pdf

Villegas Arenas, M. A. (2019). *Trichoderma pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible*. Obtenido de oriusbiotech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Características_generales_y_su_potencial_biológico_en_la_agricultura_sostenible.#:~:text=Es%20aeróbico%20y%20pueden%20estar,harzianum%20Rifai%2C%20T.

Vuppala, G., Krishna, R., & Murthy, K. (2015). *Fermentación Industrial*. Research and Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology.