

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS PARA LA PROPAGACIÓN
DEL *Trichoderma* spp.”**

AUTORA:

ARACELY NARCISA NUGRA SÁNCHEZ

TUTORA:

Dra. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD

Cuenca – Ecuador

2018

CESIÓN DE DERECHOS DEL AUTOR

Yo, Aracely Narcisa Nugra Sánchez con documento de identificación N° 0105786156 expreso mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy la autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS PARA LA PROPAGACIÓN DEL *Trichoderma spp.*”** el que ha sido desarrollado para optar por el título de: “Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales”, en la Universidad Politécnica Salesiana, está la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En la aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora, me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento que entrego el trabajo en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, febrero del 2018.

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature appears to read "Aracely N. S.".

Aracely Narcisa Nugra Sánchez

0105786156

CERTIFICACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos, declaro que, bajo mi tutoría, se desarrolló el trabajo de titulación “EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS PARA LA PROPAGACIÓN DEL *Trichoderma* spp.” realizado por Aracely Narcisa Nugra Sánchez; el trabajo experimental cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesian.

Cuenca, febrero del 2018.



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, PhD

0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Aracely Narcisa Nugra Sánchez, con número de cédula 0105786156 autora del trabajo titulado “EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS PARA LA PROPAGACIÓN DEL *Trichoderma* spp.”, certifico que el contenido total de este trabajo experimental es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, febrero del 2018.

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a hand-drawn oval. The signature reads "Aracely N. Sánchez".

Aracely Narcisa Nugra Sánchez

0105786156

DEDICATORIA

Cumplir una meta es muy importante para quien trabajó hasta llegar a la cima, y esto no se habría podido lograr sin la bendición de Dios, quien me ha dado fortaleza para cada día perseguir mi sueño.

Dedico esta tesis a quienes fueron pilares fundamentales en estos años, en especial a mi madre por su apoyo incondicional en este proyecto de vida, a mi abuelita por estar siempre pendiente y a la inspiración de más grande, mi hermana Lizeth, quien nos ha demostrado que en la vida se puede encontrar barreras que son difíciles de pasar, pero con constancia y esfuerzo se logra lo que se propone.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por iluminar nuestra mente y fortalecer nuestro corazón para alcanzar las metas que nos proponemos

A mi familia, quienes han sido mi motor y fortaleza; su esfuerzo, motivación y sacrificio que me dieron la posibilidad de llegar a culminar una carrera universitaria.

A mi directora de trabajo, Dra. Inés Malo, PhD por su paciencia, su orientación en este proceso y por brindarme su apoyo incondicional para contribuir en mi formación integral.

Al PhD. Pablo Arévalo, por sus valiosos aportes académicos y por compartir desinteresadamente sus conocimientos.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo.

Muchísimas gracias por su apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.2 Antecedentes.....	3
1.3 Justificación.....	3
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1. Objetivo general.....	4
1.4.2. Objetivos específicos.....	4
1.5 Hipótesis.....	5
CAPÍTULO 2.....	6
2. MARCO DE REFERENCIA.....	6
2.1 Hongo <i>Trichoderma</i> spp.	6
2.1.1 Morfología y taxonomía del <i>Trichoderma</i>	7
2.1.2 Características de <i>Trichoderma</i> spp.	7
2.1.3 Temperatura de crecimiento de <i>Trichoderma</i>	8
2.1.4 Control de patógenos.....	9
2.1.5 Bioprospección de <i>Trichoderma</i>	10
2.1.6 Necesidad nutricional del <i>Trichoderma</i> spp.....	10
2.1.7 Producción de <i>Trichoderma</i> spp.....	10
2.1.8 Unidad formadora de colonias.....	11
2.1.9 Unidad de análisis: condiciones de laboratorio.	11
2.1.10 Efecto de la cepa ecuatoriana de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai como antagonista.	11
2.1.11 Aplicación de <i>Trichoderma</i> para el control de enfermedades.....	11
2.1.12 Microorganismos benéficos en la agricultura.....	12
2.1.13 Propagación de <i>Trichoderma</i> spp. en sustratos.	13
2.2 Sustratos orgánicos para propagación de <i>Trichoderma</i> spp.	13
2.2.1 Residuos sólidos orgánicos.....	13
2.2.2 Restos vegetales.....	13
2.2.3 Transformación de residuos.....	13
2.2.4 Biodegradabilidad.....	14
2.2.5 Cáscara de naranja.....	14
2.2.5.1 Carbohidratos.....	14
2.2.6 Maíz.....	15
2.2.6.1 Clasificación científica.	16

2.2.6.2	Cáliz de la flor femenina.....	16
2.2.6.3	Residuales de maíz.....	16
2.2.6.4	Ovario de maíz.....	16
2.2.6.5	Composición química de la tusa del maíz.	17
2.3.	Estudios realizados de sustratos orgánicos para propagación de <i>Trichoderma</i> spp.	18
CAPÍTULO 3.....		22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....		22
3.1	Caracterización del hongo <i>Trichoderma</i> spp. del suelo por comparación morfológica con un hongo certificado, determinando su identidad	22
3.1.1	Preparación de trampas.....	22
3.1.2	Colocación de trampas.....	22
3.1.3.	Materiales.	24
3.1.4	Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.	24
3.2	Prueba microscópica y macroscópica de las características fúngicas.....	25
3.2.1	Características macroscópicas.	25
3.2.2	Características microscópicas por comparación morfológica entre las cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. y cepa de la empresa Ecocycle Biotech S. A.	26
3.3	Evaluación de sustratos a partir de residuos orgánicos para reemplazar los sustratos obtenidos de la gramínea arroz.....	29
3.3.1	Siembra de <i>Trichoderma</i> spp. en tres sustratos orgánicos.....	29
3.3.1.1	Preparación de sustratos.....	29
3.3.3.2	Siembra de <i>Trichoderma</i> spp. en cáscara de naranja, tusa de maíz y envoltura de maíz.....	30
3.3.3.3	Inoculación de <i>Trichoderma</i> spp.	31
3.4	Selección del sustrato orgánico óptimo	34
3.4.1	Cámara de Neubauer.	35
3.4.2	Cuantificación de esporas.....	35
CAPÍTULO 4.....		37
4. RESULTADOS		37
4.1	Caracterización del hongo <i>Trichoderma</i> spp. aislado del suelo por comparación morfológica con un hongo certificado determinando su identidad	37
4.1.1	Muestreo de cepas del suelo.	37
4.1.2	Prueba microscópica de las características fúngicas.	37
4.1.3	Comparación morfológica entre las cepas.....	38
4.1.4	Método estadístico no paramétrico de signos.....	40

4.2	Evaluación de sustratos a partir de residuos orgánicos mediante experimentación de laboratorio reemplazando los sustratos obtenidos de la gramínea arroz	41
4.2.1	Siembra de <i>Trichoderma</i> spp. en tres sustratos orgánicos.....	41
4.2.2	Producción de esporas por cada sustrato orgánico.	42
4.2.3	Concentración de esporas de <i>Trichoderma</i> spp. a 20 °C.....	42
4.2.4	Concentración de esporas de <i>Trichoderma</i> spp. a 25 °C.....	43
4.2.5	Concentración de esporas de <i>Trichoderma</i> spp. a 30 °C.....	44
4.3	Seleccionar el sustrato orgánico, a través del conteo de esporas, que sea óptimo para la propagación del hongo.....	45
4.4	Diseño experimental	47
4.4.1	Prueba de normalidad.	47
4.4.2.	Diseño factorial con dos factores.....	48
4.4.3	Prueba de Tukey.	49
CAPÍTULO 5.....		51
CONCLUSIONES		51
DISCUSIÓN		52
RECOMENDACIONES.....		54
Referencias bibliográficas.....		55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición fisicoquímica de la cáscara de naranja	15
Tabla 2. Clasificación científica del maíz.....	16
Tabla 3. Composición química del cáliz del maíz	16
Tabla 4. Composición química de la tusa en porcentaje.....	18
Tabla 5. Trampas para captar el hongo <i>Trichoderma</i> spp.	37
Tabla 6. Medida de estructuras de <i>Trichoderma</i> spp.....	40
Tabla 7. Presencia de <i>Trichoderma</i> spp., en trampas	41
Tabla 8. Compuestos que degrada el <i>Trichoderma</i> spp.....	41
Tabla 9. Nomenclatura.....	42
Tabla 10. Promedio diario de la concentración de esporas a 20 °C.....	43
Tabla 11. Concentración de esporas a 25 °C.	44
Tabla 12. Concentración de esporas a 25 °C	45
Tabla 13. Concentración de esporas a 20 °C, 25 °C y 30 °C.....	46
Tabla 14. Datos utilizados para ANOVA con dos factores	48
Tabla 15. Resultados del análisis de varianza.....	49
Tabla 16. Comparación de sustrato orgánico en la concentración de esporas aplicando la prueba de Tukey.....	50
Tabla 17. Comparación de temperatura en la concentración de esporas aplicando la prueba de Tukey.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hongo <i>Trichoderma</i> spp.....	6
Figura 2. Ubicación de Píleo, cantón Sígsig.....	22
Figura 3. Colocación de trampas	23
Figura 4. Trampas enterradas.....	23
Figura 5. Día 3: Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en agar PDA	25
Figura 6. Día 5: Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en agar PDA	26
Figura 7. Día 8: Crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp. en medio PDA	26
Figura 8. Conidióforos 62,97 μm	27
Figura 9. Conidióforos 62,23 μm	27
Figura 10. Fiálides 6,38 μm	27
Figura 11. Fiálides 6,43 μm	28
Figura 12. Clamidiosporas 10,1 μm	28
Figura 13. Clamidiosporas 10,3 μm	28
Figura 14. Sustrato orgánico: cáscara de naranja	29
Figura 15. Sustrato orgánico: tusa de maíz.....	30
Figura 16. Sustrato orgánico: envoltura de maíz	30
Figura 17. Siembra de <i>Trichoderma</i> spp. en cáscara de naranja	30
Figura 18. Siembra de <i>Trichoderma</i> spp., en tusa de maíz.....	31
Figura 19. Siembra de <i>Trichoderma</i> spp., en hoja de maíz	31
Figura 20. Inoculación de <i>Trichoderma</i> spp.....	32
Figura 21. Cajas Petri a 25 °C	32
Figura 22. Cinco días de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., en cáscara de naranja ..	32
Figura 23. Cinco días de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., en tusa de maíz	33
Figura 24. Cinco días de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., hoja de maíz.....	33

Figura 25. Ocho días de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., en cáscara de naranja...	33
Figura 26. Ocho días de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., en tusa de maíz	34
Figura 27. Ocho días de crecimiento de <i>Trichoderma</i> spp., en hoja de maíz.....	34
Figura 28. Cámara de Neubauer	35
Figura 29. División de la zona de conteo.....	35
Figura 30. Dilución de esporas de <i>Trichoderma</i> spp.	36
Figura 31. <i>Trichoderma</i> spp.....	38
Figura 32. <i>Trichoderma</i> spp.....	38
Figura 33. <i>Trichoderma</i> spp., tres días en agar PDA.....	39
Figura 34. <i>Trichoderma</i> spp., ocho días en agar PDA.....	39
Figura 35. <i>Trichoderma</i> spp., tres días en agar PDA.....	39
Figura 36. <i>Trichoderma</i> spp., ocho días en agar PDA.....	40

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Concentración de esporas a 20 °C	43
Gráfica 2. Concentración de esporas a 25 °C	44
Gráfica 3. Concentración de esporas a 30 °C	45
Gráfica 4. Concentración de esporas a 20 °C, 25 °C, 30 °C.....	46
Gráfica 5. Prueba de normalidad de concentración de esporas	47

ABREVIATURAS

1. °C: Centígrados.
2. ufc: unidades formadoras de colonias.
3. mL: mililitros.
4. ABC: agentes de control biológico.
5. g: gramos

RESUMEN

El uso de microorganismos para el control biológico en el campo agrícola se ha incrementado así como la aplicación de productos a base de *Trichoderma* spp. En la agricultura orgánica se utiliza la gramínea de arroz como sustrato para propagarlo. Para la presente investigación este hongo antagónico se aisló en el cantón Sígsig con el objetivo de determinar un sustrato orgánico adecuado y remplazar al arroz como medio de reproducción. Conociendo sus principales necesidades nutricionales suplementadas a través de almidón, pectina y celulosa, se utilizó la cáscara de naranja, tusa de maíz y hoja de maíz, incubándolo a 20 °C, 25 °C y 30 °C. Para seleccionar el mejor sustrato se evaluó el número de esporas por gramo de sustrato, la mejor producción se obtuvo a 30 °C en los tres sustratos; la mejor concentración se obtuvo mediante la cáscara de naranja con 7.69×10^8 ufc/mL, seguido de la tusa de maíz con 5.37×10^8 ufc/mL y la hoja de maíz con 4.11×10^8 ufc/mL. Conforme se incrementa la temperatura, mejor producción de esporas se determina en los sustratos orgánicos evaluados.

Palabras clave: *Trichoderma* spp. concentración de esporas, sustratos orgánicos.

ABSTRACT

The use of microorganisms for biological control in agriculture has increased, as well as the application of products based on *Trichoderma* spp. Rice grass is used in organic agriculture as substrate to propagate it. For this research the antagonistic fungus has been isolated from Sígsig area with the aim of determining a suitable organic substrate and replace rice as a means of reproduction. Knowing the main nutritional needs supplemented through starch, pectin, and cellulose; orange peel, corn grater, and corn leaf were used, incubating at 20 °C, 25 °C, and 30 °C. In order to select the best substrate, the number of spores per gram of substrate was tested, the best production was obtained at 30 °C in all three substrates, and the best concentration with orange peel with 7.69×10^8 ufc/mL, then the corn grater with 5.37×10^8 ufc/mL and finally corn leaf with 4.11×10^8 ufc/mL. As temperature raises, better spore production is determined in the tested organic substrates.

Key words: *Trichoderma* spp., spore concentration, organic substrates.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la industria agrícola utiliza funguicidas o pesticidas químicos en grandes cantidades y la mayoría de las veces quienes lo aplican no han tenido una capacitación previa para utilizarlos en los cultivos. El uso incorrecto de estos productos ha generado que exista un desequilibrio biológico y que día a día los suelos vayan perdiendo sus nutrientes sin la obtención de mejores cosechas lo que genera que sea necesario el incremento de agroquímicos para controlar las plagas y mejorar la producción.

En la actualidad se ha dado un impulso a la agricultura orgánica, misma que utiliza productos naturales que permiten el control de elementos patógenos, fertilización del suelo, etc., de esta manera, se obtienen productos alimenticios de calidad y se mejora la producción, así se advierte la necesidad de utilizar bioinsumos que puedan ser elaborados a partir de organismos benéficos como insectos, hongos, bacterias y virus o bien, extractos de plantas.

A todo nivel los biofunguicidas se elaboran a partir del hongo *Trichoderma* spp. (Endara Borja, 2009).

El éxito de las cepas de *Trichoderma* spp. como ABC (agentes de control biológico) se debe a su elevada capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir en condiciones ambientales perjudiciales, eficiencia en el uso de nutrientes, capacidad para transformar la rizósfera, fuerte ataque contra hongos fitopatógenos y eficiencia en promoción del desarrollo en plantas e inducción de mecanismos de defensa (Benites & Rincón, 2004).

La multiplicación de *Trichoderma* spp. se puede realizar en forma artesanal o industrial, poniendo en marcha distintas técnicas de fermentación líquida y/o sólida. Entre los sustratos naturales para la producción de estos hongos antagonistas se encuentran granos de trigo, avena, cebada, centeno, arroz, maíz, soya, cabecilla de arroz y salvado de trigo, inclusive desechos de los propios sistemas productivos como papa. Las experiencias de producción artesanal de *Trichoderma* spp. en distintos países, se han basado en el uso del arroz como sustrato (Sivila & Álvarez Jujuy, 2013).

Se ha utilizado la gramínea de arroz como sustrato para propagar este hongo antagonista, cuyo cultivo se constituye como uno de los más importantes a nivel mundial y nacional, debido a su gran aporte nutricional. En el Ecuador el rendimiento promedio

nacional de arroz para la temporada del primer cuatrimestre del 2014 de 4,67 t/ha mientras que el potencial de los cultivos es de seis toneladas (Moreno Aguirre, 2014), para alcanzar el rendimiento potencial de las distintas variedades se recomienda potencializar la participación de los productores en capacitaciones sobre el manejo del cultivo. Además, se debe focalizar la entrega de los *kits* tecnológicos hacia los cantones de menor rendimiento, que son los que presentan bajos volúmenes de fertilización y tecnificación del arroz utilizándose también sus derivados como el tamo o arrocillo. Entre otros podemos mencionar el bagazo de la caña, almidón de la papa y productos que provienen de la industria alimenticia.

En esta industria se tiene otra alternativa, utilizar residuos orgánicos alimenticios como cáscara de naranja, el ovario del maíz o llamado también tusa y el cáliz de la flor femenina llamado también envoltura del maíz, sustratos que cumplen con las necesidades nutricionales como almidón, pectina y celulosa entre otros que son necesarios para su crecimiento.

1.1 Planteamiento del problema

En el campo agrícola se utilizan agroquímicos para interrumpir la propagación de seres vivos considerados plagas, afectando al medio ambiente, a la salud de los seres humanos y animales. En cambio, la agricultura orgánica es un procedimiento que utiliza productos de origen animal o vegetal para mantener un equilibrio de las plagas que afectan a los cultivos, de esta manera, se ha impulsado la producción de bioinsumos a partir de microorganismos como el *Trichoderma* spp. Para propagar este hongo antagonista se utiliza como sustrato el arroz.

Esta gramínea es cultivada en la Costa, y en cantidades poco significativas en las estribaciones andinas y en la Amazonía. Las provincias de Guayas y Los Ríos tienen el 83 % de la superficie sembrada a nivel nacional; mientras tanto que Manabí presenta un 11 %, Esmeraldas, Bolívar y Loja un 1 % cada una; el cultivo y producción de arroz debido a sus condiciones climáticas y edáficas benefician de manera significativa el sistema productivo arrocero (Árbito, 2017) (Silvana Santana, 2014)

En el segundo cuatrimestre del 2016 el rendimiento promedio a nivel nacional del arroz fue de 4.80 t/ha. Dentro de los problemas externos que afectan a la producción del cereal tenemos a las plagas o enfermedades (Árbito, 2017), (Castro A., 2016).

Con el paso del tiempo la producción monocultivista del arroz y la presencia de plagas han ocasionado que su rendimiento sea menor al de su capacidad por hectárea, motivo por el cual esta gramínea no sería ideal para utilizarla como sustrato y propagar un hongo benéfico, ya que se afectaría directamente a la soberanía alimentaria de los ecuatorianos canalizando el uso del arroz a la industria agrícola.

1.2 Antecedentes

En la provincia del Azuay, cantón Sígsig, parroquia San Bartolomé se encuentra ubicado el Laboratorio de Bioinsumos con capacidad para producir 1200 litros semanales de bioinsumo a partir de *Trichoderma* spp., utilizando arroz como sustrato porque cumple las necesidades nutricionales de almidón, pectina y celulosa, entre otras.

En el año 2016 se realizó el trabajo de investigación «Evaluación de dos especies de *Trichoderma* para el manejo de enfermedades fúngicas que afectan al cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* Mill) a nivel radicular en condiciones de invernadero» empleando la gramínea del arroz para reproducir la cepa matriz a una cepa nieta y una bisnieta (Encalada Ríos, 2016).

En la provincia de Chimborazo se realizó el estudio «Determinación de la estabilidad y viabilidad de *Trichoderma harzianum*» en cinco sustratos para la elaboración de biofungicidas en formulación líquida, en este se utilizó el arroz y sus derivados como sustratos para propagar el *Trichoderma* spp. (Guilcapí Ávalos, 2016).

En países como Honduras y México se encuentran trabajando en la producción de bioinsumos de varios microorganismos y dentro de esta rama producen bioinsumos a partir del *Trichoderma* spp., utilizando el arroz y sus derivados como sustratos para su propagación y cosecha.

1.3 Justificación

Muñoz (2010) afirma que «en los últimos años la agricultura orgánica ha ido tomando importancia mundial, cada día crece el interés de las personas por consumir productos más sanos y saludables».

Para que el Ecuador mejore en la producción de alimentos y estos provengan de una agricultura orgánica, se ve la necesidad de potencializar el uso de productos que procedan

de microorganismos antagonistas. Sin duda como es una rama que está en desarrollo resulta muy costoso.

La Biotecnología estudia las alternativas con las que se podrían potencializar los bioproductos, así tenemos la propagación de un hongo antagonista como es el *Trichoderma* spp., utilizando como sustratos el arroz y sus derivados; si se canalizara el uso de esta gramínea para este fin se desequilibraría el aspecto alimentario en nuestro país.

Los productos obtenidos a partir de los residuos agroindustriales tienen un interés creciente, porque permiten disminuir el impacto ambiental y los costos en el tratamiento y disposición final de dichos residuos en las industrias.

Una alternativa sería el uso de residuos orgánicos que cumplan con las necesidades nutricionales del hongo *Trichoderma* spp. antagonista más utilizado mundialmente debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aislado y cultivado, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos (cáscara de naranja, tusa y la envoltura del maíz).

1.4 Objetivos

1.4.1. Objetivo general.

Determinar sustrato orgánico reemplazando el arroz como medio de reproducción de *Trichoderma* spp.

1.4.2. Objetivos específicos.

1. Caracterizar el hongo *Trichoderma* spp. del suelo por comparación morfológica con un hongo certificado determinando su identidad.
2. Evaluación de sustratos a partir de residuos orgánicos a través de experimentación de laboratorio reemplazando los sustratos obtenidos de la gramínea del arroz.
3. Seleccionar el sustrato orgánico, a través del conteo de esporas que sea óptimo para su reproducción.

1.5 Hipótesis

Si el hongo el *Trichoderma* spp. se desarrolla en un sustrato orgánico, entonces se podría utilizar para su reproducción.

CAPÍTULO 2

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Hongo *Trichoderma* spp.

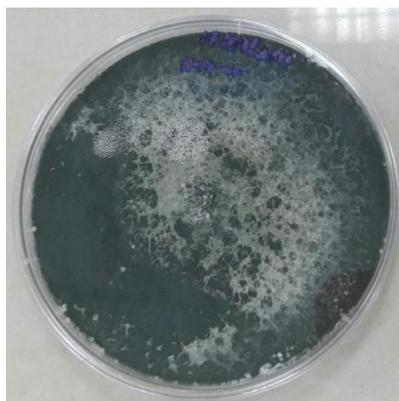


Figura 1. Hongo *Trichoderma* spp.

Fuente: Autor

Según Subramian (1983), «el hongo de género *Trichoderma* spp. presenta especies de hongos filamentosos que pertenecen al reino Mycetae, división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales y familia Moniliaceae» (Argumedo, Alarcón, Ferrera, & Peña, 2009)

El género *Trichoderma* spp. es un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en un número importante de suelos agrícolas, con abundante materia orgánica en descomposición y altas densidades de raíces. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de otros hongos que atacan a los cultivos. *Trichoderma* spp. se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, además, se suelen hallar asociados a la superficie de plantas y cortezas de madera descompuesta de diferentes zonas y hábitats (Harman & Kubicek, 2008).

«El hongo *Trichoderma* spp. produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas (conidias)» (Sivila & Álvarez Jujuy, 2013).

Las esporas son los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol. *Trichoderma* es el principal producto a obtener en la producción comercial y/o artesanal (Sivila & Álvarez Jujuy, 2013)

La presencia de *Trichoderma* spp. en los suelos agrícolas y naturales en todo el mundo es una evidencia de ser un excelente competidor por el espacio, recursos nutricionales y plasticidad ecológica. *Trichoderma* compete por nutrientes principalmente carbono, nitrato y hierro. Entre las cualidades que favorecen la competencia de este hongo antagonista se encuentran la alta velocidad de desarrollo que posee gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en bloquear el paso al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista (Acosta Toro, 2015), (Vallejo Illijama, 2014).

2.1.1 Morfología y taxonomía del *Trichoderma*.

Trichoderma siendo un hongo imperfecto que carece de estructuras de reproducción sexual, se encuentra en suelos agrícolas y en ambientes como madera que decae, por su capacidad reproductiva, el crecimiento y propagación de este hongo es notorio en presencia de materia orgánica y humedad, siendo tolerantes a temperaturas extremas, pH y salinidad; la mayoría pertenece a un género de hongos saprofitos, siendo habitantes comunes del suelo (Argumento Delira, Alarcón, Ferrera Cerrato, & Peña Cabriales, 2009).

Pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, familia Moniliaceae, posee conidióforos erectos o arrastrados, altamente ramificados, más o menos cónicos, débil o fuertemente verticilados. Las fiálides tienen apariencia de un juego de bolos en racimos o separadas, desde las cuales son sostenidas las conidias no septadas, subglobosas a elipsoidales y viscosas. Comúnmente forma clamidosporas, intercaladas o raramente terminales, las cuales son globosas a elipsoidales, hialinas y de pared suave. Las colonias en cultivo usualmente son de rápido crecimiento, suaves, blancas a verdes (Cook & Baker, 1989).

2.1.2 Características de *Trichoderma* spp.

Uno de los organismos biocontroladores más exitoso para el control de enfermedades producidas por patógenos del suelo ha sido el hongo mico parásito *Trichoderma* spp. por lo que Sivila & Álvarez Jujuy (2013) da a conocer las características más importantes de este hongo:

- Se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas.
- Se puede encontrar en diferentes zonas y hábitats, especialmente donde existe materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así, como en residuos de cultivos.
- Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces las cuales coloniza rápidamente.
- *Trichoderma* es un hongo anaerobio facultativo.
- La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, después se toma a verde oscuro amarillento, como consecuencia de una densa esporulación.
- Las esporas son las más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol. *Trichoderma* es el principal producto a obtener en la producción comercial y/o artesanal.
- Es capaz de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos para su desarrollo gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras).
- *Trichoderma* es un hongo con una alta capacidad de tolerar un amplio rango de temperaturas, presentando una extensa distribución ecológica.
- Los valores óptimos para su desarrollo y esporulación oscilan alrededor de los 25 °C, un factor importante a tener en cuenta durante la multiplicación es la conveniencia de períodos alternados de luz y oscuridad, que favorezcan la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos.

2.1.3 Temperatura de crecimiento de *Trichoderma*.

Las temperaturas de crecimiento de *Trichoderma spp.* señalan que la temperatura de activación del crecimiento miceliar de *T. harzianum* fue de 8 a 10 °C y la temperatura óptima de crecimiento de 25 a 28 °C, alcanzando un máximo de 35 °C. Estos datos muestran la alta capacidad de *Trichoderma spp.* de tolerar un amplio rango de temperaturas (Humeres Valenzuela, 2004).

2.1.4 Control de patógenos.

El interés científico despertado por los hongos de este género se debe a las características antagonicas que presentan frente a hongos fitopatógenos. Entre los mecanismos de control referenciados para *Trichoderma spp.* están la competencia por nutrientes o espacio, el mico parasitismo y la antibiosis. Estos tres mecanismos no son excluyentes, sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos. La importancia relativa de cada uno de ellos depende de cada pareja antagonismo-patógeno y de las condiciones ambientales (Harman & Kubicek, 2008), (Chet, Ibar, & Hadar, 2012), (Belanger, Dufour, Caron, & Benhamon, 2015).

Actualmente, el biocontrol ocupa un lugar importante dentro de las prácticas de manejo de enfermedades de las plantas causadas por los patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium* entre otros (Tovar Castaño, 2008).

Las especies de *Trichoderma* poseen buenas posibilidades en este sentido como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos anti fúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuye los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolación, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (Stefanova, Leiva, Larrinaga, & Coronado, 1999).

Los mecanismos de acción del *Trichoderma spp.*, según Perdomo (1995) manifiesta que:

- El mico parasitismo se considera como un atributo de todas las especies de *Trichoderma spp.* y el mejor mecanismo de control biológico de distintas enfermedades fúngicas.
- El proceso de destrucción de los patógenos por el hongo *T. harzianum*, en el cual invierten una gran cantidad de enzimas que son capaces de segregar sustancias antibióticas.
- El mecanismo de «competencia» que poseen algunas cepas de *Trichoderma* se considera esencial para la prevención de enfermedades, pues la zona colonizada no podrá ser ocupada por ningún patógeno.
- Debido al aumento de desarrollo de las raíces que se genera por la secreción de fitohormonas, existe una mejora en la tolerancia al estrés hídrico.

- En algunos casos se especula la capacidad de solubilización de algunos nutrientes minerales como zinc o fósforo, escasamente solubles o insolubles.

2.1.5 Bioprospección de *Trichoderma*.

La bioprospección de microorganismos antagonistas como *Trichoderma* spp. es una de las alternativas actuales para combatir hongos fitopatógenos. La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación lo han convertido como uno de los antagonistas más utilizados para el control fitosanitario. En la actualidad, Cuba es uno de los países que produce 250 toneladas de biopreparados por año, mediante una capacidad instalada, que permiten proteger más de 100 000 hectáreas (Fernández & Vega, 2001).

2.1.6 Necesidad nutricional del *Trichoderma* spp.

Las necesidades nutricionales de *Trichoderma* spp. son bien conocidas. Es capaz de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros y emplearlos para su beneficio gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras). Así mismo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuesto tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (proceso de fermentación sólida para la producción de *Trichoderma* spp. a partir de los residuos agroindustriales cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanum tuberosum*)).

2.1.7 Producción de *Trichoderma* spp.

La producción semi industrial e industrial de *Trichoderma* es una alternativa tecnológica muy eficiente desde el punto de vista productivo y económico para la obtención de biofunguicidas de alta calidad; involucra procesos estandarizados con el control de variables como humedad, temperatura y flujo de aireación. Este último muy importante puesto que puede mejorar la cantidad y calidad de las esporas producidas. (Agosin E., 1997).

2.1.8 Unidad formadora de colonias.

Velásquez *et al.* (2009), considera que cada colonia se desarrolla en el medio de cultivo de elección después de cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada; los microorganismos son capaces de formar la colonia, lo cual se conoce como unidad formadora de colonia UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de sembrarlas en el medio de cultivos.

2.1.9 Unidad de análisis: condiciones de laboratorio.

Para el desarrollo óptimo de los hongos es muy importante controlar diferentes condiciones como son la temperatura, humedad y sustrato en el laboratorio, de esta manera, se puede aumentar o disminuir la velocidad de reproducción o propagación. (Gato & Rodríguez, 2010)

2.1.10 Efecto de la cepa ecuatoriana de *Trichoderma harzianum* Rifai como antagonista.

El hongo *Trichoderma* se utiliza en el control biológico de microorganismos denominados plagas. En Ecuador se ha utilizado para inhibir el desarrollo de la Sigatoka negra en las plantaciones de banano de la Costa (Orozco Santos, *et al.*, 2008).

2.1.11 Aplicación de *Trichoderma* para el control de enfermedades.

Se ha demostrado que mediante la aplicación de *Trichoderma* en el suelo durante la pre siembra, siembra y post emergencia prematura se puede controlar las enfermedades en valores superiores al 60 % en los cultivos, como también permite controlar la aparición temprana de los síntomas de las enfermedades en las plantas (Endara Borja, 2009).

Según Erazo (s. f.) la aplicación de *Trichoderma* presenta los siguientes beneficios:

- Un control eficaz de enfermedades de plantas.
- Posee un amplio rango de acción.

- Este hongo se propaga en el suelo, aumenta su población y ejerce control duradero en el tiempo sobre hongos fitopatógenos.
- Ayuda a descomponer materia orgánica, haciendo que los nutrientes se conviertan en formas disponibles para la planta, por lo tanto, tiene un efecto indirecto en su nutrición.
- *Trichoderma* estimula el crecimiento de los cultivos porque posee metabolitos que promueven los procesos de desarrollo en las plantas.
- Puede ser aplicado en compostaje para acelerar el proceso de maduración, el cual a su vez contendrá el hongo cumpliendo además con la función de biofunguicida.
- Favorece la proliferación de organismos benéficos en el suelo, como otros hongos antagónicos.
- No necesita plazo de seguridad para recolección de la cosecha.
- Preservación del medio ambiente al disminuir el uso de funguicidas.
- Economía en los costos de producción de los cultivos.
- Ataca patógenos de la raíz y del follaje antes que puedan ser detectados y evita el ataque de *Phytophthora*.
- Previene enfermedades dando protección a la raíz y al follaje.
- Promueve el crecimiento de pelos absorbentes y raíces alimenticias, mejorando la nutrición y la absorción de agua.
- Disminuye o elimina la dependencia de fumigantes químicos.
- No se ha registrado ningún efecto fitotóxico.

2.1.12 Microorganismos benéficos en la agricultura.

En el Ecuador se viene trabajando en el análisis de microorganismos que contrarresten las enfermedades fúngicas de los cultivos prescindiendo del uso de productos químicos. En la provincia de Tungurahua se ha desarrollado un estudio de tres géneros del hongo *Trichoderma* como organismo benéfico para uso en la agricultura conociendo que este hongo antagonista actúa como controlador de enfermedades y aumenta el desarrollo radicular.

Trichoderma contribuye al crecimiento de profundidad de raíces de las plantas volviendo a los cultivos más resistentes. La colonización de *Trichoderma* ahorra un 40 % de fertilizante nitrogenado e inhibe la acción de otros hongos. Puede degradar organoclorados, clorofenoles y otros insecticidas como DDT, endosulfán,

pentacloronitrobenzeno, aldrin y herbicidas con trifluralin y glifosato (Agamez Ramos, Zapata Navarro, Oviedo Zumaque, & Barrera Violeth, 2008). El hongo *Trichoderma* produce enzimas: celulosas, hemicelulosas y xilanasas, las cuales degradan con facilidad toda la materia vegetal en descomposición.

2.1.13 Propagación de *Trichoderma* spp. en sustratos.

La propagación del hongo en sustratos se la realiza con el fin de mantener activas las cepas del hongo para que puedan ser procesadas dentro de un producto agrícola, estas una vez purificadas en cajas Petri en medio PDA, son colocadas dentro de sustratos como arroz o arrocillo, que cumplen con sus necesidades nutricionales como almidón, pectina y celulosa (Agamez Ramos, Zapata Navarro, Oviedo Zumaque, & Barrera Violeth, 2008).

2.2 Sustratos orgánicos para propagación de *Trichoderma* spp.

2.2.1 Residuos sólidos orgánicos.

Flores (2011) define como residuos orgánicos a «todo material que proviene de restos de productos de origen orgánico y que pueden ser metabolizados por medios biológicos por ejemplo: restos de comida, de jardinería, madera, frutas y verduras».

2.2.2 Restos vegetales.

Alvarado y Olives (2013) consideran que «son residuos provenientes de podas o deshierbe de jardines u otras áreas verdes; también algunos residuos de cocina que no han sido sometidos a procesos de cocción como legumbres, cáscaras de frutas, etc.».

2.2.3 Transformación de residuos.

La gestión integral de residuos sólidos involucra la transformación de los mismos ya sea física, química o biológica, pudiendo ser la combustión y producción de abonos, así nos permite recuperar producción de conversión como por ejemplo: compost, energía y

biogás, reduciendo la cantidad de materiales que terminan en el relleno sanitario e incrementando su vida útil (Alvarado Gualoto & Olives Erazo, 2013).

2.2.4 Biodegradabilidad.

Capacidad que tiene un residuo sólido en degradarse mediante la acción de agentes biológicos sean estos microorganismos o insectos, debido principalmente a su composición de carbohidratos. Un factor importante es la presencia de lignina ya que determina la fracción biodegradable; en los residuos orgánicos sólidos representa un 0,4 %.

2.2.5 Cáscara de naranja.

La naranja (*Citrus sinensis* L.) es uno de los principales productos que se cultiva en el Ecuador; con una producción de 150 000 t en zonas de clima cálido.

El consumo per cápita de naranja en el Ecuador es de 4,14 kg, aprovechándose más o menos el 50 % de la fruta mientras la otra mitad está constituida por cáscaras y semillas que son desechadas. La utilización de estos residuos sólidos podría tener un alto potencial en otras áreas como en la biotecnología.

Los residuos de naranja contienen una gran cantidad de pectinas, celulosa y polisacáridos, conjunto de moléculas de azúcar unidas entre sí.

2.2.5.1 Carbohidratos.

El nivel de carbohidratos en los residuos de la cáscara de naranja es del 80,8 %; en esta categoría tenemos a la pectina que representa el 30-50 %, azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa), hemicelulosa, del 10-20 % y celulosa del 20-40 % (Essilfie, 1985).

Tabla 1. Composición fisicoquímica de la cáscara de naranja

Componentes principales (%)	Materia seca	90
	Proteína	6
	Carbohidratos	62,7
	Grasas	3,4
	Fibra	13
	Cenizas	6,9
Minerales (%)	Calcio	2
	Magnesio	0,16
	Fósforo	0,1
	Potasio	0,62
	Azufre	0,06
Vitaminas (mg/kg)	Colina	770
	Niacina	22
	Ácido pantoténico	14,96
	Riboflavina	22,2
Aminoácidos (%)	Arginina	0,28
	Cistina	0,11
	Lisina	0,2
	Metionina	0,11
	Triptófano	0,06

Fuente: Arroyo & G., 2004

2.2.6 Maíz.

El maíz (*Zea mays* L.) se considera como uno de los tres granos básicos que la humanidad utiliza para su alimentación.

El maíz pertenece al grupo de las gramíneas y es originario del continente americano, a nivel mundial anualmente se produce 645 414 836,10 toneladas (t), siendo Estados Unidos, Argentina y Francia los principales países exportadores. En el Ecuador se producen maíz duro seco en las provincias de Guayas y Los Ríos en la Región Costa representando el 73,41 % de la producción nacional; en las provincias de Bolívar, Cotopaxi y Azuay se cultiva en menor proporción. Cuando el grano ha alcanzado entre el 22 y 24 % de humedad es el punto óptimo para la cosecha.

2.2.6.1 Clasificación científica.

Tabla 2. Clasificación científica del maíz

Nombre común	Maíz
Nombre científico	<i>Zea mays</i>
Familia	Gramíneas
Género	<i>Zea</i>

Fuente: Toledo Álvarez, 2008

2.2.6.2 Cáliz de la flor femenina.

El cáliz de la flor femenina es también conocido como envoltura del maíz.

Tabla 3. Composición química del cáliz del maíz

Compuesto	%
Holocelulosa	78,86
α - Celulosa	43,14
Lignina	23,00
Cenizas	0,76

Fuente: Hurter, 1997

2.2.6.3 Residuales de maíz.

Este cultivo genera gran cantidad de biomasa aérea (vegetación), se cosecha el 50 % en forma de grano, el resto corresponde a diversas estructuras de la planta tales como caña, hojas de panoja y otras. La producción de biomasa residual que genera el maíz de grano (cañas, hojas, chalas y corontas) fluctúa entre 20 y 25 toneladas por hectárea, por lo que existiría una disponibilidad potencial entre 1 y 3,5 millones de toneladas (Toledo Álvarez, 2008).

2.2.6.4 Ovario de maíz.

El ovario de maíz es llamado también tusa. Las mazorcas llamadas también inflorescencias femeninas están ubicadas en una o más espigas solitarias y axilares de las

hojas, son espigas de forma cilíndrica con un raquis central o tusa donde se insertan las espiguillas por pares, que formarán grandes granos, los cuales van desde 400 a 1000 por mazorca.

La tusa del maíz (*Zea mays*) se encuentra entre las fuentes de recursos no maderables con un alto contenido de xilanas, por lo que ha sido considerado de interés como fuente alternativa de diferentes compuestos químicos de interés comercial o industrial, entre otras fuentes de biomasa (Córdoba, Delgado, & Toriz, 2010) (Samanta, *et al.*, 2012) (Oliveira, *et al.*, 2010).

La tusa es un residuo o subproducto agrícola que se genera en grandes cantidades en el proceso de separación del grano de la mazorca y se estima que por cada tonelada de maíz se obtienen 170 kg de tusa (CIMMYT, 1995).

En el 2010 según datos estadísticos la producción mundial de maíz fue de 844 millones de toneladas y se estima que genero alrededor de 144 millones de toneladas de tusa por año (FAOSTAT, 2012).

Según las referencias, la tusa se ha utilizado para la aplicación como forraje para rumiantes, soporte para disminuir la erosión en la tierra y también como sustratos para la producción de la enzima xilanas (Knob & Cano, 2010).

Por otro lado, el alto contenido de hemicelulosas (34 %) de la tusa, del cual aproximadamente el 94 % corresponde a xilanas, hace muy atractivo este residuo para el desarrollo de fertilizantes nitrogenados con acción prolongada o de lenta liberación (Caro & Frank, 1929), (Radlein, Piskorz, & Majerski, 1997), (Coca, Álvarez, & Fuertes, 1984) (Martínez, *et al.*, 1992), (Simón, Sinhg, & Weil, 2005), (Castro, Gavi, Peña Cabriales, Núñez, & Etchevers, 2006), (González, *et al.*, 2006), (Mora-Ravelo, *et al.*, 2007) (Kabel, Zeevalking, Voragen, & Schols, 2007).

2.2.6.5 Composición química de la tusa del maíz.

El residuo del desgranado del maíz (*Zea mays* L.) se conoce como tusa de maíz, un tejido esponjoso y blanco que representa la médula donde se almacenan las reservas alimenticias del cereal (Robledo Olivo, Noé Aguilar, & Montañez Sáenz, 2014).

Tabla 4. Composición química de la tusa en porcentaje

COMPONENTES DE LA TUSA DEL MAÍZ	%
Celulosa	45
Hemicelulosa	35
Lignina	15

Fuente: Roble Olivo, Noé Aguilar, & Montañez Sáenz, 2012

2.3. Estudios realizados de sustratos orgánicos para propagación de *Trichoderma* spp.

En el presente trabajo investigativo se estudiarán diferentes sustratos orgánicos que cumplen con las necesidades nutricionales para propagar a un hongo antagonista como es el *Trichoderma* spp., de esta manera, se ha realizado una revisión del estado del arte de investigaciones sobre la «Evaluación de sustratos orgánicos para la propagación del *Trichoderma* spp.».

Gómez Bolívar (2017) presentó su investigación sobre la «Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de *Trichoderma* spp. mediante fermentación en el líquido y sólido». Utilizó este hongo porque se caracteriza por su capacidad de antagonizar patógenos y evaluó los siguientes sustratos: arroz, puntilla – granza, puntilla – granza – linaza y puntilla – broza, bajo diferentes condiciones teniendo como resultado que los mejores sustratos para propagar son puntilla – granza – linaza y puntilla – granza.

Guilcapí Ávalos (2016) realizó un estudio sobre la «Determinación de la estabilidad y viabilidad de *Trichoderma harzianum* Rifai en cinco sustratos usados para la elaboración de un biofunguicida en formulación líquida». Analizó cinco sustratos para propagar una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* en donde se utilizó cascarilla de arroz mezclado con arroz partido entre otros, comprobándose que la estabilidad del producto influye con el tipo de sustrato usado en la formulación y la temperatura, demostrando que el tratamiento más eficaz es el sustrato de harina de trigo.

Según Irimia Hernández, Rodríguez Hernández, & Castellanos Gonzales, (2016) trabajaron sobre los «Niveles de humedad, cepa y cantidad de sustrato arroz entero para la producción de *Trichoderma* spp.»; la importancia que adquiere a nivel local, nacional y mundial el cosechar utilizando agricultura orgánica conlleva a estudiar diferentes metodologías amigables con el medioambiente y aptas para la salud. Así, este estudio se

realizó con diferentes volúmenes de arroz como sustrato y porcentajes de humedad a una temperatura de 20 °C con la finalidad de obtener un biopreparado, en el cual se realizó pruebas de concentración de esporas ufc/g, viabilidad, virulencia y pureza teniendo excelentes resultados y aseguran que los agricultores pueden utilizar este producto a partir de un microorganismo benéfico y cultivar sin el uso de agroquímicos.

«Eficiencia de crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai para la producción de bioplaguicida aprovechando el residuo agroindustrial del cáscara de haba (*Vicia faba* L)» es la investigación realizada por Serpa Barahona (2015), para evaluar si la cáscara de haba podía ser utilizada como sustrato para propagar *Trichoderma harzianum* Rifai, teniendo como testigo un sustrato a base de cascarilla de arroz. Los resultados estadísticos muestran que la cascarilla de arroz tiene una viabilidad del 96,94 % y la cáscara de haba, 92,76 %; porcentaje menor por la rigidez de este grano que no permite la degradación completa por el hongo referente a la consistencia quebradiza del sustrato testigo, sin embargo, recomiendan su uso.

Moya, García, Avilés, Andújar, & Núñez (2014) en su trabajo de «Aislamiento de cepas *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana» aislaron este hongo por su potencial antagonista en el control de hongos fitopatógenos radiculares; utilizaron 35 muestras de suelos, 16 sustratos y 38 muestras de raíces.

Ávila Cubilos, Goretti Ramírez, & Lizcano Toledo (2014) realizaron el «Aislamiento de *Trichoderma* sp. en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial en Angostura de Campoalegre (Huilla)» y consideran a este hongo como una de las mejores alternativas para el control biológico de fitopatógenos en el suelo. Para el trampeo y captación del hongo utilizaron como sustrato el arroz, teniendo éxito y dejando una brecha abierta para que futuros estudios realicen ensayos de antagonismo *in vitro* con patógenos fúngicos.

«Reproducción del hongo *Trichoderma harzianum* (biofunguicida) aprovechando desechos agroindustriales (residuos de papa, tamo de fréjol, bagazo de caña)» es el estudio llevado a cabo por Endara Borja (2009) en el que se concluye que el mejor sustrato a utilizar son los residuos de papa y bagazo de caña por permitir un excelente desarrollo de las esporas de este hongo.

Agamez Ramos, Zapata Navarro, Oviedo Zumaque, & Barrera Violeth (2008) llevaron adelante la «Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp.», analizaron trece sustratos para la producción

de esporas de *Trichoderma sp.*, teniendo como mejor resultado de sustrato el compuesto por cascarilla de algodón enriquecida con soluciones de melaza y semillas de *Artocarpus incisa* (fruta de pan).

Michel Aceves, Otero Sánchez, Martínez Rojero, & Rodríguez Morán (2008) realizaron en México un estudio sobre la «Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos» con el objetivo de buscar alternativas para propagar este hongo antagonista utilizando quince sustratos. Para determinar su efectividad realizó análisis químicos proximales, desarrollo de micelio, esporulación y viabilidad de las esporas, teniendo una buena producción aquellos sustratos orgánicos con un alto porcentaje de humedad, bajo contenido de minerales, proteína y grasa y un porcentaje intermedio de fibra.

Con relación al uso de *Trichoderma spp.* para el control de plagas en los cultivos, Encalada Ríos (2016) realizó la «Evaluación de dos especies de *Trichoderma* para el manejo de enfermedades fúngicas que afectan al cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* Mill) a nivel radicular en condiciones de invernadero» porque en la zona del Austro se presentan enfermedades de la raíz en el cultivo de tomate de mesa generando grandes pérdidas; se buscó alternativas para tratar este problema con el uso de microorganismos que actúen como inhibidores, antagonistas o parásitos con respecto a otros. Dentro de este grupo de microorganismos benéficos está el *Trichoderma* que se utilizó para controlar *Phytophthora sp.*, y *Fusarium sp.*, siendo muy eficiente.

Martínez, Infante, & Reyes (2013) presentaron su trabajo sobre «*Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos» realizado con el objeto de dar a conocer la importancia del hongo antagonista *Trichoderma spp.* dentro del campo agrícola, como agente de control biológico de hongos y nematodos y su acción como inductor a la resistencia en las plantas y estimulador de crecimiento.

Martínez Fernández (2012) estudió la «Evaluación de tres cepas de *Trichoderma spp.* como alternativa de biocontrol contra *Phytophthora capsici* L. en plántulas de pimiento morrón bajo» en Chile, donde se presentan pérdidas del 60 hasta el 100 % de los cultivos, buscando utilizar microorganismos benéficos como agentes de biocontrol, representando una alternativa para combatir a los organismos patógenos.

Minchala Valencia & Moreira Bustamante (2007) realizaron el «Proyecto de inversión para la elaboración de bioproductos con microorganismos para el control de las enfermedades de las plantas», analizaron los microorganismos benéficos, dentro de este grupo se incluyen a las bacterias, hongos, virus, protozoos y algas microscópicas,

mencionando en específico al género *Trichoderma*. Siendo este un controlador natural de enfermedades que se encuentran en el suelo y produciendo sustancias estimuladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas.

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de esta tesis investigativa-experimental de evaluación de sustratos orgánicos para la propagación del *Trichoderma spp.* se aíslan las cepas del hongo en estudio y después se evalúan *in vitro* los sustratos orgánicos óptimos para su reproducción a diferentes temperaturas para determinar las condiciones óptimas de propagación.

La presente investigación fue desarrollada en la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca, en el Área de Microbiología en los Laboratorios de Ciencias de la Vida.

3.1 Caracterización del hongo *Trichoderma spp.* del suelo por comparación morfológica con un hongo certificado, determinando su identidad

3.1.1 Preparación de trampas.

Se prepararon trampas estériles con melaza, caldo de res y arroz precocido, disponiendo en tarrinas plásticas que fueron selladas con un tejido poroso con la ayuda de una liga. Posteriormente fueron llevadas al campo.

3.1.2 Colocación de trampas.

Se colocaron trampas para captar el hongo en estudio *Trichoderma spp.* en el sector de Píleo, cantón Sígsig, provincia del Azuay.

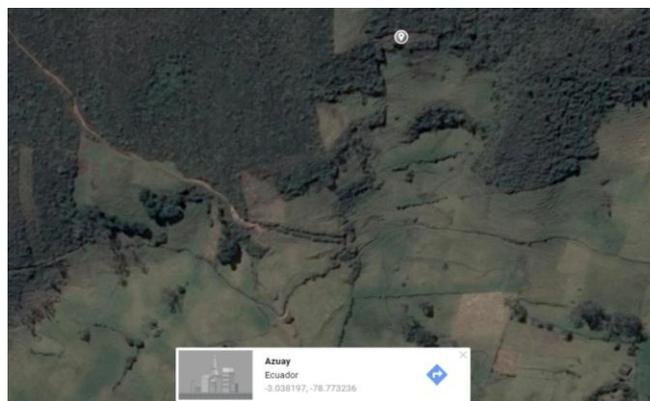


Figura 2. Ubicación de Píleo, cantón Sígsig

Fuente: Google Maps

Se tienen cuatro sustratos para captar el hongo *Trichoderma* spp., arroz precocido, arroz precocido más melaza sólida, arroz precocido más melaza líquida, arroz precocido más caldo de res, posteriormente con una pala se realizaron orificios de 15 cm de profundidad en un terreno ubicado en el sector de Píleo con el objetivo de colocar las trampas construidas con recipientes desechables en donde se encuentra el sustrato. Se enterraron e identificaron las trampas mediante banderas.



Figura 3. Colocación de trampas

Fuente: Autor



Figura 4. Trampas enterradas

Fuente: Autor

Al cabo de ocho días se sacaron las trampas; cada una de estas se colocó en una funda con cierre con su respectiva identificación y se trasladaron al laboratorio para aislar el hongo de interés. En las trampas que contenían arroz precocido se observó la presencia de características propias del *Trichoderma* spp. como su coloración verdosa;

posteriormente se sembraron los granos con coloración verdosa en medio PDA (papa dextrosa agar).

3.1.3. Materiales.

- Arroz
- Carne de res
- Melaza
- Tarrinas plásticas
- Media nylon
- Ligas
- Pala
- Banderas para identificar
- Fundas Ziploc
- Autoclave
- Balanza electrónica
- Lunas de reloj
- Matraz
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo
- Vórtex
- Suero fisiológico
- Cámara de Neubauer

3.1.4 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Se siembran los granos con coloración verdosa encontrados en las trampas y al cabo de seis días se observa el crecimiento del hongo *Trichoderma* spp. Con un asa se toma una pequeña porción de la colonia y se coloca en el centro de una nueva caja de agar con PDA, se sella con Parafilm y finalmente, se etiqueta con nombre del hongo y fecha. A 25 °C se incuban las muestras por un período de 5 días, asegurándose que crezca únicamente al *Trichoderma* spp. en PDA (papa dextrosa agar).

3.2 Prueba microscópica y macroscópica de las características fúngicas

3.2.1 Características macroscópicas.

Para realizar la caracterización del *Trichoderma* spp. se realizó el refrescamiento de las cepas, transfiriendo nuevamente al medio PDA e incubando a 25 °C. Las colonias son fácilmente reconocibles por su rápido crecimiento y coloración blanca; presentando anillos concéntricos. Conforme avanza su desarrollo el micelio toma un color verde oscuro posterior a la esporulación.

Las colonias por lo general, crecen en un medio con un pH ácido con valores entre 4.5 y 5. de esta manera, se desarrollan y alcanzan su madurez rápidamente. Otro parámetro muy importante para su desarrollo es la humedad puesto que prefieren un elevado porcentaje de humedad y alta concentración de dióxido de carbono en su entorno atmosférico. En las siguientes figuras 5, 6 y 7 se muestran las características que presenta *Trichoderma* spp.

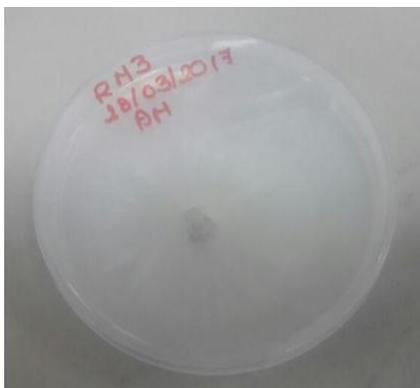


Figura 5. Día 3: Crecimiento de *Trichoderma* spp. en agar PDA

Fuente: Autor

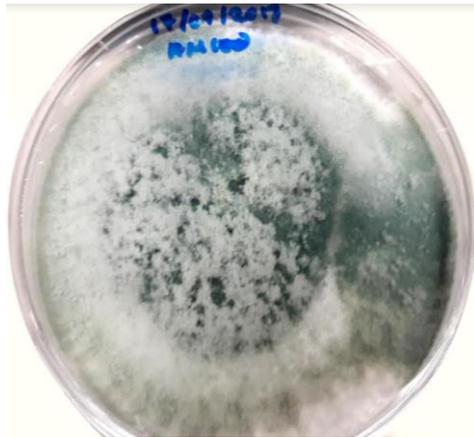


Figura 6. Día 5: Crecimiento de *Trichoderma* spp. en agar PDA
Fuente: Autor

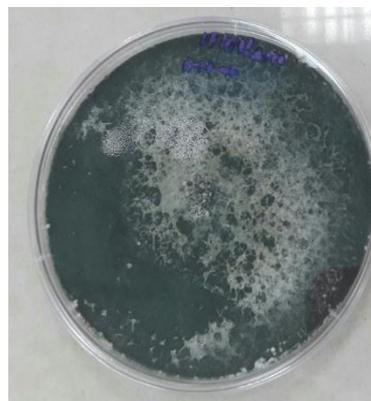


Figura 7. Día 8: Crecimiento de *Trichoderma* spp. en medio PDA
Fuente: Autor

3.2.2 Características microscópicas por comparación morfológica entre las cepas nativas de *Trichoderma* spp. y cepa de la empresa Ecocycle Biotech S. A.

La estructura de ramificación de esta especie tiene forma de pirámide, sus conidióforos oscilan entre 62,5 a 69 μm . Estas estructuras microscópicas presentan un color verde, con varias ramificaciones dispuestas perpendicularmente y en algunas ocasiones se pueden observar la formación de ramificaciones laterales que forman grupos de dos o tres dispuestas en un ángulo muy amplio. Como se observa en la figura captada por la autora y en la figura de Ecocycle Biotech S. A. misma que sirve de patrón para compararla.



Figura 8. Conidióforos 62,97 μm
Fuente: Autor

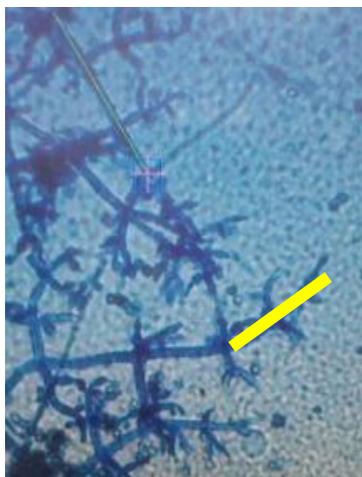


Figura 9. Conidióforos 62,23 μm
Fuente: Ecocycle Biotech S. A.

Las fiálides son estructuras largas y delgadas, distribuidas de forma independiente a lo largo de su eje, asimétricas con tamaños que van desde los 6.3 a 15.6 μm siendo citriformes y subglobosos.



Figura 10. Fiálides 6,38 μm
Fuente: Autor

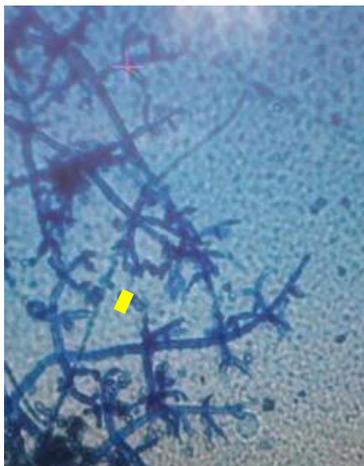


Figura 11. Fiálides 6,43 μm

Fuente: Ecocycle Biotech S. A.

Las clamidiosporas están dispuestas en forma intercalada y formadas por el micelio sumergido. Son subglobosas, con una pared dentada, de color verde suave y un tamaño de 10 a 12,5 μm .

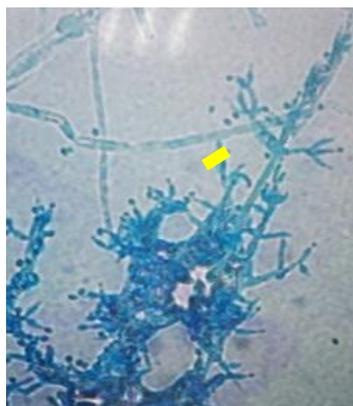


Figura 12. Clamidiosporas 10,1 μm

Fuente: Autor

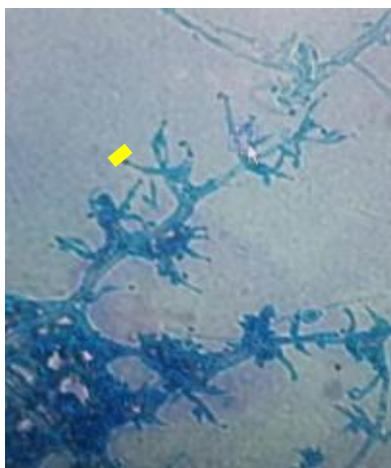


Figura 13. Clamidiosporas 10,3 μm

Fuente: Ecocycle Biotech S. A.

3.3 Evaluación de sustratos a partir de residuos orgánicos para reemplazar los sustratos obtenidos de la gramínea arroz

El sustrato es la materia prima donde crece el micelio. Las propiedades fisicoquímicas del residuo son las que determinan qué hongo o microorganismo pueda crecer en él.

Para la producción de microorganismos, y que estos a su vez puedan realizar de forma adecuada la síntesis celular y producir metabolitos cuando estos lo necesiten, los sustratos empleados deben tener en lo posible todos los nutrientes necesarios. En el cultivo de *Trichoderma* spp., cuando se producen esporas el elemento que en más cantidad se encuentra es el carbono, en tanto que el porcentaje de nitrógeno se convierte en un factor que limita el crecimiento de los microorganismos. Como en muchos procesos la relación carbono nitrógeno es fundamental, en la producción de *Trichoderma* también es muy importante para la formación de esporas. (Poalacín, 2015)

3.3.1 Siembra de *Trichoderma* spp. en tres sustratos orgánicos.

3.3.1.1 Preparación de sustratos.

Se lavan los sustratos con agua destilada: cáscara de naranja, tusa de maíz y envoltura de maíz. Se pesan 20,58 g y se colocan en un matraz de 250 mL sellando con algodón y forrado con papel aluminio, luego se dispone en la autoclave para esterilizar. Terminado este proceso se llevan los matraces a la cámara de flujo laminar en donde se realizará la siembra del *Trichoderma* spp.



Figura 14. Sustrato orgánico: cáscara de naranja

Fuente: Autor



Figura 15. Sustrato orgánico: tusa de maíz

Fuente: Autor



Figura 16. Sustrato orgánico: envoltura de maíz

Fuente: Autor

3.3.3.2 Siembra de *Trichoderma* spp. en cáscara de naranja, tusa de maíz y envoltura de maíz.

Cada sustrato se prepara por triplicado, poniendo en cada caja Petri 6,85 g de sustrato, se siembra una fracción el *Trichoderma* spp., del medio sólido finalmente se etiqueta y sella con Parafilm.



Figura 17. Siembra de *Trichoderma* spp. en cáscara de naranja

Fuente: Autor



Figura 18. Siembra de *Trichoderma* spp., en tusa de maíz

Fuente: Autor



Figura 19. Siembra de *Trichoderma* spp., en hoja de maíz

Fuente: Autor

3.3.3.3 Inoculación de *Trichoderma* spp.

Las cajas Petri con los sustratos de cáscara de naranja, tusa y envoltura de maíz tierno, que han sido previamente inoculadas, se ponen en la estufa a una temperatura de 25 °C para su crecimiento.



Figura 20. Inoculación de *Trichoderma* spp.

Fuente: Autor



Figura 21. Cajas Petri a 25 °C

Fuente: Autor

Todos los días se revisa el crecimiento de *Trichoderma* spp. Al quinto día se observa:



Figura 22. Cinco días de crecimiento de *Trichoderma* spp., en cáscara de naranja

Fuente: Autor



Figura 23. Cinco días de crecimiento de *Trichoderma* spp., en tusa de maíz

Fuente: Autor



Figura 24. Cinco días de crecimiento de *Trichoderma* spp., hoja de maíz

Fuente: Autor

A los ocho días de crecimiento del hongo *Trichoderma* spp., se observa que los sustratos están invadidos por el hongo en estudio.

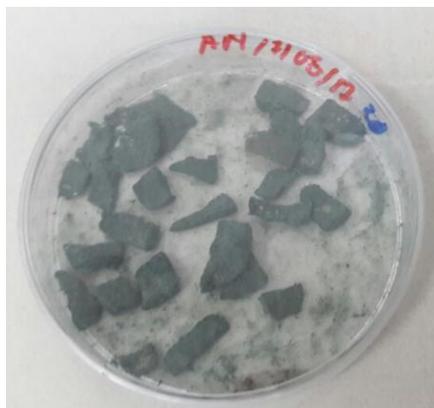


Figura 25. Ocho días de crecimiento de *Trichoderma* spp., en cáscara de naranja

Fuente: Autor

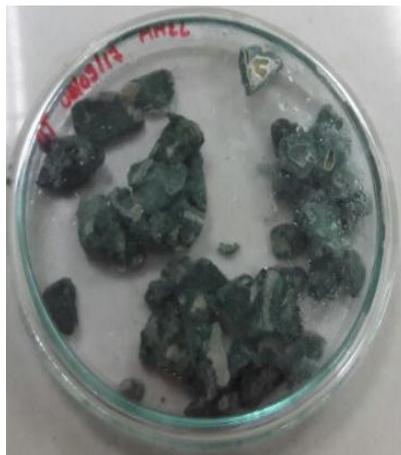


Figura 26. Ocho días de crecimiento de *Trichoderma* spp., en tusa de maíz
Fuente: Autor



Figura 27. Ocho días de crecimiento de *Trichoderma* spp., en hoja de maíz
Fuente: Autor.

Este proceso de siembra de *Trichoderma* spp. para propagación en los sustratos orgánicos en estudio, se replicó incubando a temperaturas de 20 y 30 °C para determinar en qué sustrato y a qué temperatura se propaga de manera óptima.

3.4 Selección del sustrato orgánico óptimo

Para determinar la cantidad de esporas por mililitro se pesaron por triplicado 1 g de cada sustrato orgánico y se realizó una dilución 10^{-3} de cada uno.

3.4.1 Cámara de Neubauer.

También conocida como hematocitómetro, se utiliza para contar células u otras partículas en suspensión bajo el microscopio.

Las más comunes son las cámaras dobles, donde existen dos zonas de conteo, en su parte central se encuentra grabada una retícula rectangular (Villarreal Villota, 2015).

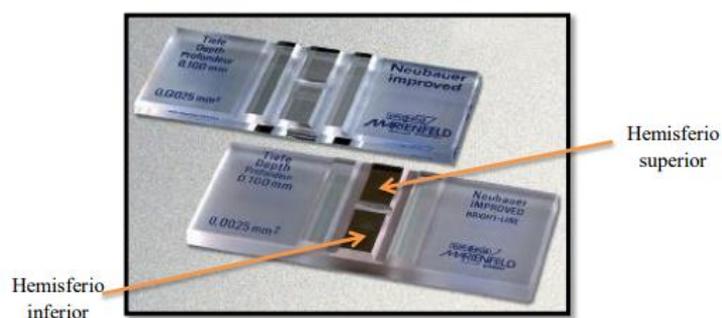


Figura 28. Cámara de Neubauer

Fuente: Bastidas

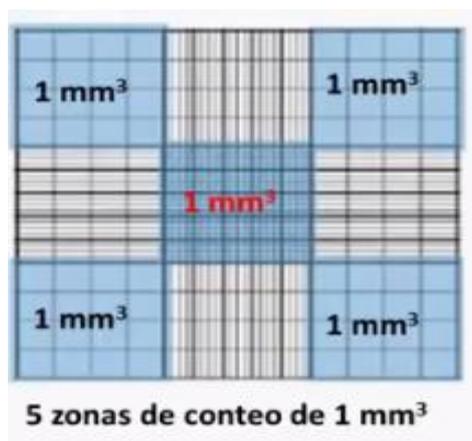


Figura 29. División de la zona de conteo

Fuente: Bastidas

3.4.2 Cuantificación de esporas.

Se realiza diluciones seriadas, colocando 1 g de sustrato de las cajas Petri de producción en 10 mL de suero fisiológico (NaCl 0,9 %), luego se agitan mediante vórtex hasta que las esporas se desprendan (la cáscara de naranja, tusa y hoja de maíz deben perder el color verdoso debido al hongo), esta solución se denomina solución madre.

Tomar 1 mL de la solución madre en 9 mL de suero fisiológico (dilución 10^{-1}), continuar diluyendo hasta obtener una dilución 10^{-3} .

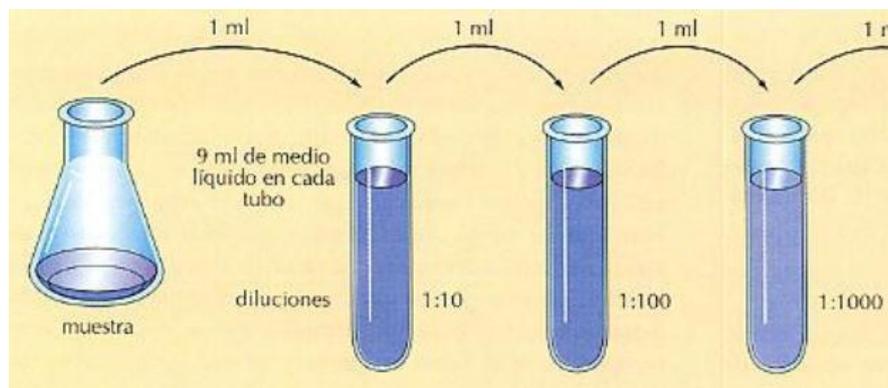


Figura 30. Dilución de esporas de *Trichoderma* spp.

Fuente: Juárez, 2014

Con una micropipeta se colocó una gota de la dilución 10^{-3} preparada en la cámara de Neubauer y se observó al microscopio con un aumento de 40x.

La concentración de esporas por mL se calcula con la fórmula planteada por Bastidas.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10\,000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización del hongo *Trichoderma* spp. aislado del suelo por comparación morfológica con un hongo certificado determinando su identidad

4.1.1 Muestreo de cepas del suelo.

Se colocaron 40 trampas para captar el *Trichoderma* spp., en el sector de Píleo a una profundidad de 15 cm de la superficie del suelo, como se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 5. Trampas para captar el hongo *Trichoderma* spp.

Muestra	Sustrato	Profundidad a nivel del suelo	Coordenadas
M1-M10	Arroz precocido	15 cm	Lan-3.038265 Lon-78.773193
M10-M20	Arroz precocido y melaza sólida	15 cm	Lan-3.038265 Lon-78.773193
M21-M30	Arroz precocido y melaza líquida	15 cm	Lan-3.038265 Lon-78.773193
M31-M40	Arroz precocido y caldo de res	15 cm	Lan-3.038265 Lon-78.773193

Fuente: Autor

4.1.2 Prueba microscópica de las características fúngicas.

Durante la clasificación de las trampas colocadas en el sector de Píleo para captar al hongo de interés, se identificaron cepas de *Trichoderma* spp. en las trampas de arroz precocido.

Se observan las estructuras microscópicas del *Trichoderma* spp. apreciando hifas septadas y unicelulares, de estas estructuras se desprenden los conidióforos cortos, abundantes y ramificados, las fiálides se presentan globosas e hialinas, en tanto que los conidios son abundantes y de forma ovoidal.



Figura 31. *Trichoderma* spp.

Fuente: Autor

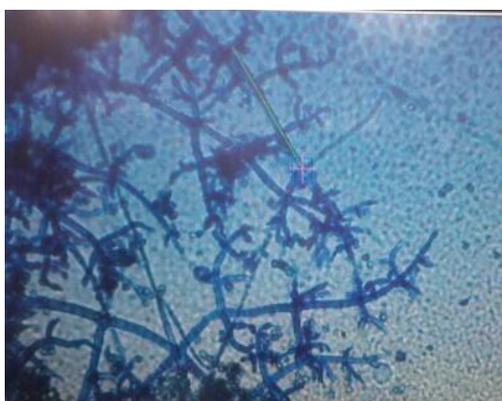


Figura 32. *Trichoderma* spp.

Fuente: Ecocycle Biotech S. A.

4.1.3 Comparación morfológica entre las cepas.

Se observa el crecimiento del *Trichoderma* spp. aislado por la autora y la cepa de Ecocycle Biotech S. A. en donde se aprecian las hifas septadas y unicelulares, de estas estructuras se desprenden los conidióforos cortos, abundantes y ramificados. Las fiálides se presentan globosas e hialinas, en tanto que los conidios son abundantes y de forma ovoidal.



Figura 33. *Trichoderma* spp., tres días en agar PDA

Fuente: Autor

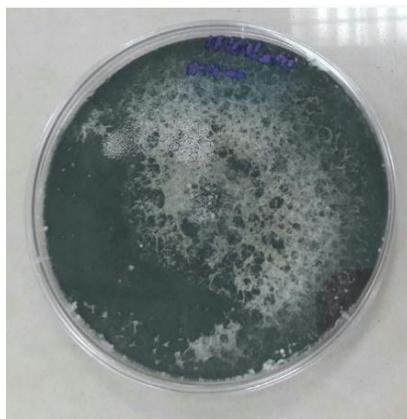


Figura 34. *Trichoderma* spp., ocho días en agar PDA

Fuente: Autor

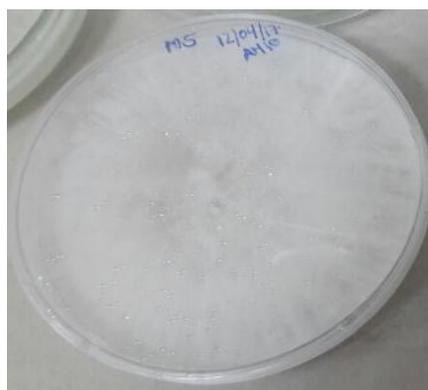


Figura 35. *Trichoderma* spp., tres días en agar PDA

Fuente: Ecocycle S. A.

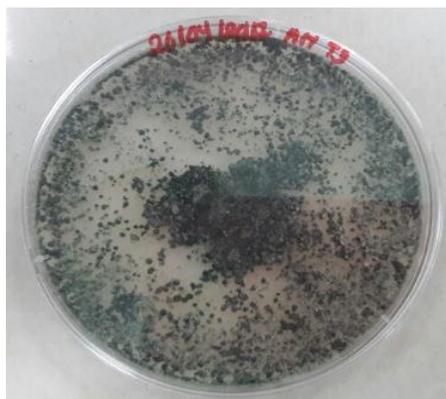


Figura 36. *Trichoderma* spp., ocho días en agar PDA

Fuente: Ecocycle S. A.

Las estructuras antes mencionadas fueron medidas del hongo aislado y del proporcionado por Ecocycle S. A., concluyendo que el hongo aislado presenta todas las características para *Trichoderma* spp.

Tabla 6. Medida de estructuras de *Trichoderma* spp.

Estructuras	<i>Trichoderma</i> spp., aislado por autora	<i>Trichoderma</i> spp., Ecocycle Biotech S. A.
Conidióforos	62.97 μm	62.23 μm
Fiálides	6.38 μm	6.43 μm
Clamidosporas	10.1 μm	10.3 μm

Fuente: Autor

4.1.4 Método estadístico no paramétrico de signos.

Las trampas (con arroz precocido) que se colocaron en el sector de Píleo tuvieron la presencia de *Trichoderma* spp.

Tabla 7. Presencia de *Trichoderma spp.*, en trampas

Trampa	Sustrato	Presencia de hongo <i>Trichoderma spp.</i>
M1-M10	Arroz precocido	+
M11-M20	Arroz precocido y melaza sólida	-
M21-M30	Arroz precocido y melaza líquida	-
M31-M40	Arroz precocido y caldo de res	-

Fuente: Autor

4.2 Evaluación de sustratos a partir de residuos orgánicos mediante experimentación de laboratorio reemplazando los sustratos obtenidos de la gramínea arroz

4.2.1 Siembra de *Trichoderma spp.* en tres sustratos orgánicos.

Para determinar los sustratos orgánicos a utilizar se realizó un análisis de los compuestos que degrada el *Trichoderma spp.* y los compuestos de cada sustrato a utilizar, de esta manera, se determina cuáles son los óptimos a emplear como medio de propagación del *Trichoderma spp.*

Tabla 8. Compuestos que degrada el *Trichoderma spp.*

Compuestos que degrada el <i>Trichoderma spp.</i>	Cáscara de naranja	Envoltura de maíz	Tusa de maíz
Almidón Pectina Celulosa Enzimas Nitrógeno	Pectina Celulosa Enzimas Polisacáridos Azúcares Aminoácidos Minerales Vitaminas	Holocelulosa α -Celulosa Lignina Cenizas	Xilanas Hemicelulosas Nitrógeno Celulosa Lignina

Fuente: Moore, 2011

4.2.2 Producción de esporas por cada sustrato orgánico.

La temperatura de cultivo oscila entre los 20 y 30 °C; de esta manera, se analiza la propagación en los sustratos orgánicos del hongo en estudio a tres temperaturas: 20 °C, 25 °C y 30 °C.

Para determinar la producción de esporas de *Trichoderma* spp., en sustratos orgánicos, se realizó un conteo de esporas en la cámara de Neubauer utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \times 10\,000}{\text{número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

A los sustratos orgánicos utilizados en esta investigación se les da la siguiente denominación:

Tabla 9. Nomenclatura

Sigla	Nomenclatura
S1	cáscara de naranja
S2	tusa de maíz
S3	hoja de maíz
T1	20 °C
T2	25 °C
T3	30 °C

4.2.3 Concentración de esporas de *Trichoderma* spp. a 20 °C.

Se realiza por triplicado el conteo de esporas de cada sustrato desde el quinto al octavo día, se determina que el mejor sustrato es la cáscara de naranja con 5.11×10^8 ufc/mL, seguido por la tusa de maíz con 3.14×10^8 ufc/mL y al último la hoja de maíz con 3.11×10^8 ufc/mL al octavo día.

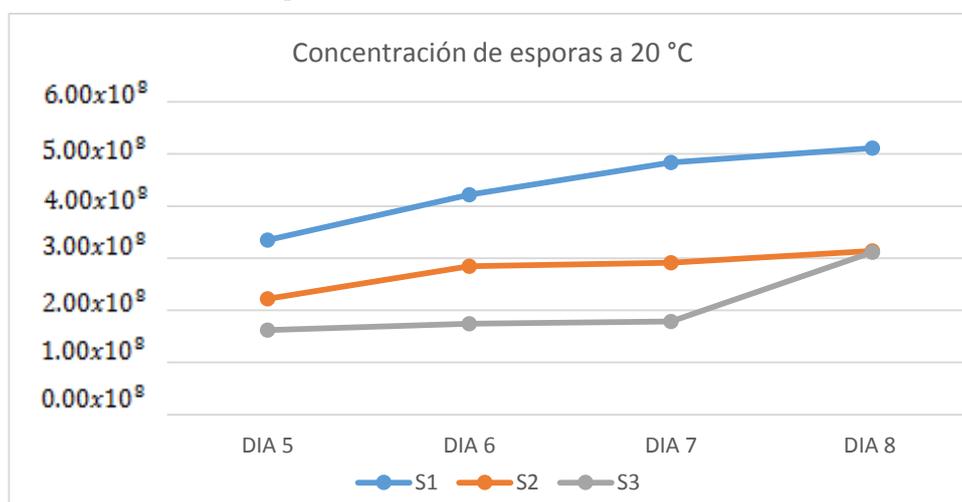
Tabla 10. Promedio diario de la concentración de esporas a 20 °C

	S1	S2	S3
DÍA 5	3.35×10^8	2.22×10^8	1.62×10^8
DÍA 6	4.22×10^8	2.85×10^8	1.75×10^8
DÍA 7	4.84×10^8	2.91×10^8	1.79×10^8
DÍA 8	5.11×10^8	3.14×10^8	3.11×10^8

Fuente: Autor

En la gráfica 1 se observa la curva de crecimiento, teniendo la mayor cantidad de esporas la cáscara de naranja.

Gráfica 1. Concentración de esporas a 20 °C



Fuente: Autor

4.2.4 Concentración de esporas de *Trichoderma* spp. a 25 °C

Seguidamente se realiza por triplicado el conteo de esporas de cada sustrato orgánico desde el quinto al octavo día, en donde se determina que el mejor sustrato es la cáscara de naranja con 6.85×10^8 ufc/mL, seguido por la tusa de maíz con 4.34×10^8 ufc/mL y por último la hoja de maíz con 3.30×10^8 ufc/mL al octavo día.

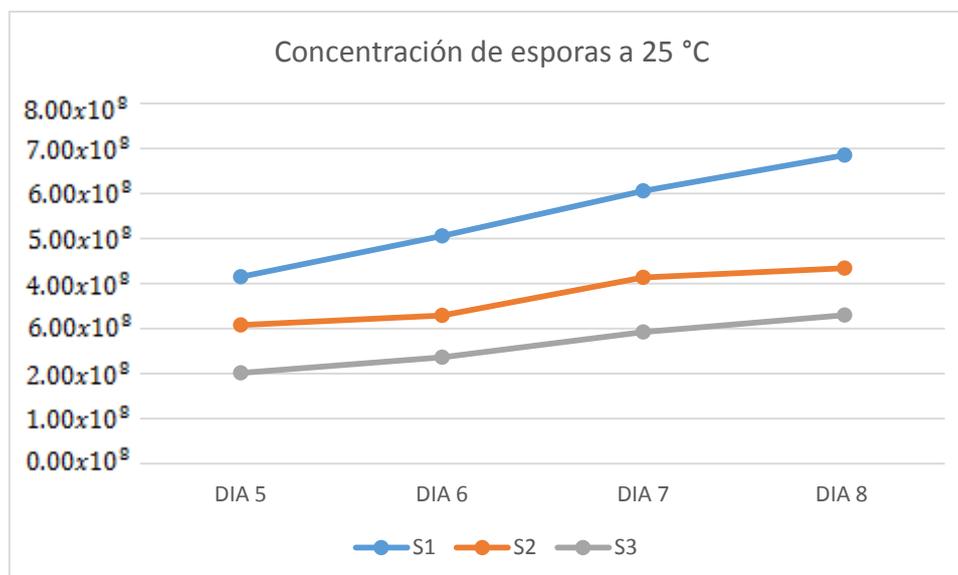
Tabla 11. Concentración de esporas a 25 °C.

	S1 ufc/mL	S2 ufc/mL	S3 ufc/mL
DÍA 5	4.15X 10 ⁸	3.08X 10 ⁸	2.01X 10 ⁸
DÍA 6	5.06X 10 ⁸	3.29X 10 ⁸	2.36X 10 ⁸
DÍA 7	6.06X 10 ⁸	4.13X 10 ⁸	2.92X 10 ⁸
DÍA 8	6.85X 10 ⁸	4.34X 10 ⁸	3.30X 10 ⁸

Fuente: Autor

En la gráfica 2 se observa el crecimiento de la curva de la producción de esporas conforme pasa los días, se determina que la cáscara de naranja tiene mayor ufc/mL.

Gráfica 2. Concentración de esporas a 25 °C



Fuente: Autor

4.2.5 Concentración de esporas de *Trichoderma* spp. a 30 °C

A 30 °C la concentración de este hongo por ufc/mL es mayor en la cáscara de naranja con 7.69X 10⁸ ufc/mL, seguido por la tusa de maíz con 5.37X 10⁸ ufc/mL y en menor concentración la hoja de maíz con 4.11X 10⁸ ufc/mL.

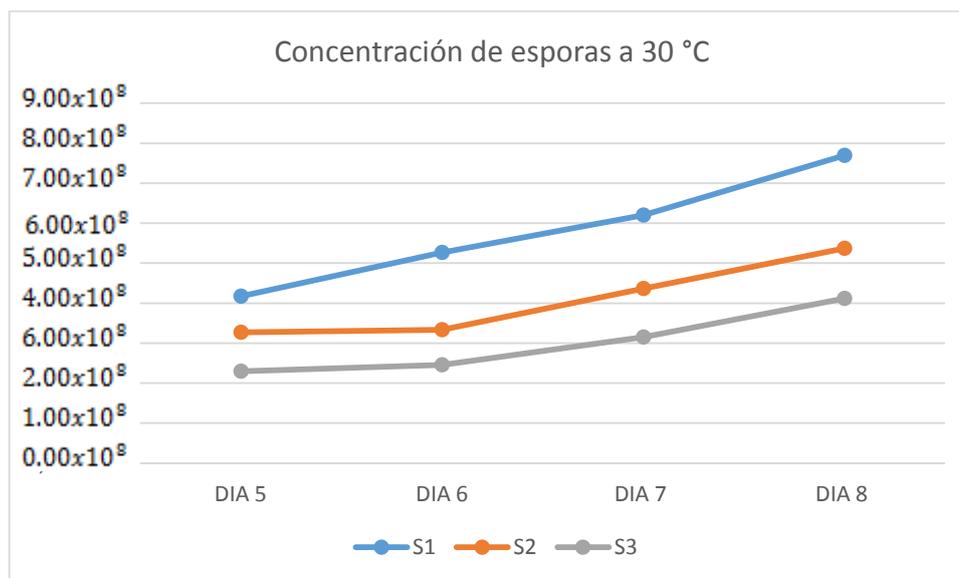
Tabla 12. Concentración de esporas a 25 °C

	S1 ufc/mL	S2 ufc/mL	S3 ufc/mL
DÍA 5	4.17X 10 ⁸	3.27X 10 ⁸	2.30X 10 ⁸
DÍA 6	5.27X 10 ⁸	3.33X 10 ⁸	2.46X 10 ⁸
DÍA 7	6.20X 10 ⁸	4.37X 10 ⁸	3.15X 10 ⁸
DÍA 8	7.69X 10 ⁸	5.37X 10 ⁸	4.11X 10 ⁸

Fuente: Autor

En la siguiente curva podemos observar que la concentración de esporas incrementa de acuerdo como pasa los días.

Gráfica 3. Concentración de esporas a 30 °C



Fuente: Autor

4.3 Seleccionar el sustrato orgánico, a través del conteo de esporas, que sea óptimo para la propagación del hongo

Para propagar el hongo *Trichoderma spp.* se utilizaron como sustratos orgánicos la cáscara de naranja, tusa y hoja de maíz a temperaturas de 20 °C, 25 °C y 30 °C, realizando un conteo de esporas desde el quinto al octavo día.

Humeres Valenzuela (2004) señala que la temperatura de activación del crecimiento micelial es de 8 a 10 °C y la temperatura óptima de crecimiento de 25 a 28

°C, alcanzando un máximo a los 35 °C. Estos datos muestran la alta capacidad de *Trichoderma* spp. para tolerar un amplio rango de temperaturas.

La temperatura en el cantón Sígsig, de donde se aisló el hongo, oscila entre los 19-25 °C. En la presente tesis se trabajó con temperaturas de 20 °C, 25 °C y 30 °C teniendo mejor concentración de esporas al octavo día a 30 °C en la cáscara de naranja como se observa en la tabla 13: cada sustrato orgánico incrementa sus ufc/mL conforme se incrementa la temperatura.

Se determina que el mejor sustrato orgánico para la propagación de *Trichoderma* spp. es la cáscara de naranja teniendo 7.69×10^8 ufc/mL a 30 °C.

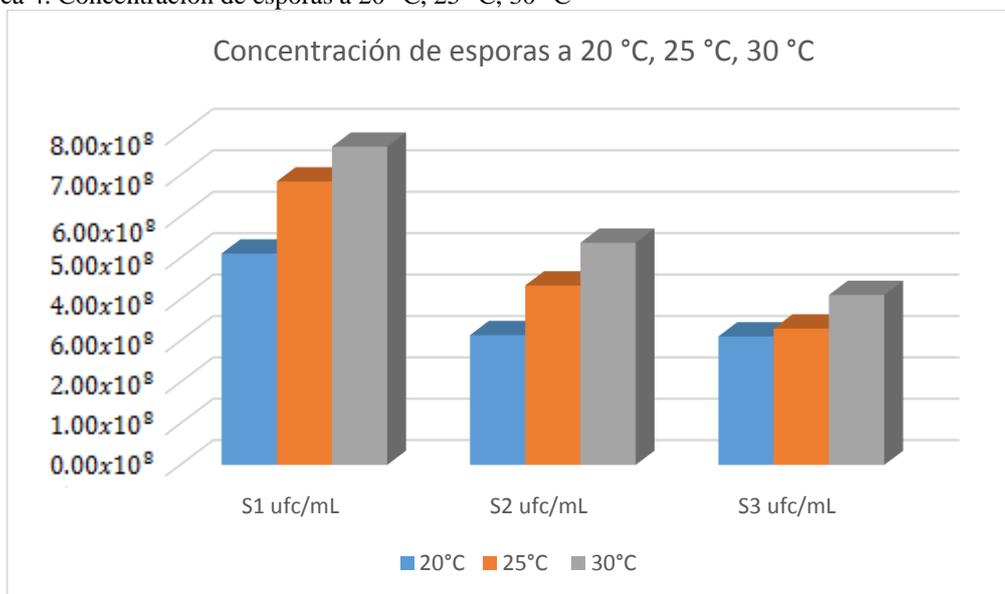
Tabla 13. Concentración de esporas a 20 °C, 25 °C y 30 °C

	T1 ufc/mL	T2 ufc/mL	T3 ufc/mL
20°C	5.11×10^8	3.14×10^8	3.11×10^8
25°C	6.85×10^8	4.34×10^8	3.30×10^8
30°C	7.69×10^8	5.37×10^8	4.11×10^8

Fuente: Autor

El gráfico 4 se observa que a la temperatura de 20 °C, 25 °C, 30 °C la cáscara de naranja tiene mayor cantidad de ufc/mL.

Gráfica 4. Concentración de esporas a 20 °C, 25 °C, 30 °C



Fuente: Autor

4.4 Diseño experimental

4.4.1 Prueba de normalidad.

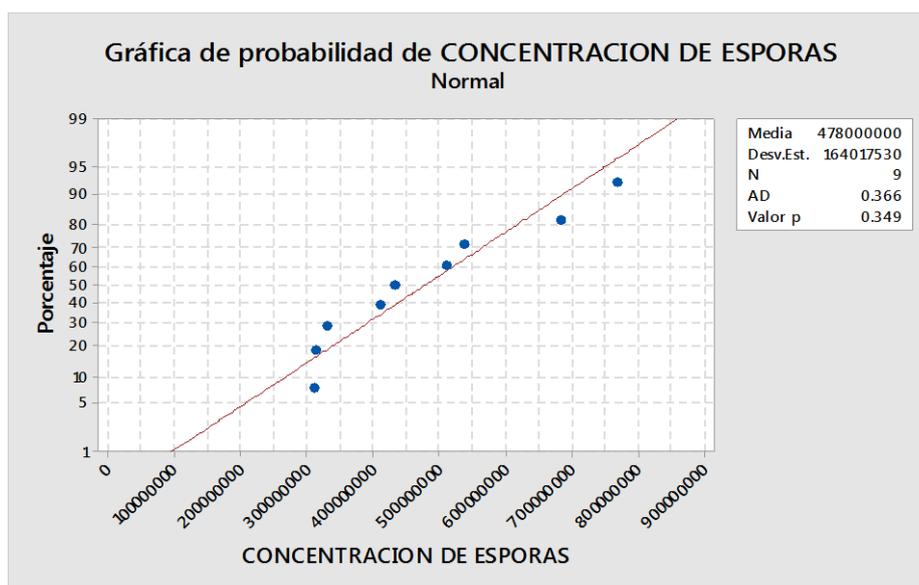
«El estadístico Shapiro-Wilks mide la fuerza del ajuste con una recta. Cuanto mayor sea este estadístico mayor desacuerdo habrá con la recta de normalidad» (SPSS, 2017), por lo que se puede rechazar la hipótesis nula. Esta prueba se considera como la más potente para muestras inferiores a 30 casos.

Planteamiento de hipótesis:

- H_0 : Los datos siguen una distribución normal
- H_1 : los datos no siguen una distribución normal

Con el 95 % de confianza

Gráfica 5. Prueba de normalidad de concentración de esporas



Fuente: Autor

Mediante el gráfico 5, se observa que el valor p es 0,349, siendo mayor a 0,05 por lo que la muestra procede de una población normal, encontrándose cada punto cerca de la línea de normalidad.

4.4.2. Diseño factorial con dos factores.

Se realiza esta prueba con el objetivo de analizar el sustrato orgánico utilizado y la temperatura asignada sobre la concentración de esporas producidas por el hongo *Trichoderma* spp. para esto proceso se realiza un análisis de varianza (ANOVA) con dos factores.

Tabla 14. Datos utilizados para ANOVA con dos factores

TEMPERATURA	SUSTRATO ORGÁNICO	CONCENTRACIÓN DE ESPORAS
T1	S1	5.11×10^8
T1	S2	3.14×10^8
T1	S3	3.11×10^8
T2	S1	6.85×10^8
T2	S2	4.34×10^8
T2	S3	3.30×10^8
T3	S1	7.69×10^8
T3	S2	5.37×10^8
T3	S3	4.11×10^8

Fuente: Autor

Para realizar este método estadístico se siguen los siguientes pasos:

– **Planteamiento de H_0 e H_1**

a. Para las columnas o sustratos orgánicos utilizados.

H_0 : La concentración de esporas producidas en cada sustrato orgánico son iguales.

H_1 : La concentración de esporas producidas en cada sustrato orgánico no son iguales.

b. Para las filas o temperatura utilizadas.

H_0 : La concentración de esporas producidas a 20 °C, 25 °C y 30 °C son iguales.

H_1 : La concentración de esporas producidas a 20 °C, 25 °C y 30 °C no son iguales.

- Nivel de significancia $\alpha = 5 \% = 0.05$

- La distribución de muestro a ser utilizada será «Razón F»

- Se realiza un análisis en Minitab con los datos de la Tabla 14, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 15. Resultados del análisis de varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TEMPERATURA	2	5.63727×10^{16}	2.81863×10^{16}	12,79	0,018
SUSTRATO ORGÁNICO	2	1.50029×10^{17}	7.50143×10^{16}	34,05	0,003
Error	4	8.81267×10^{15}	2.20317×10^{15}		
Total	8	2.15214×10^{17}			

Fuente: Autor

En la Tabla 15 se observa el resultado de F de prueba correspondiente a las filas o temperaturas que es de 12.79 y el correspondiente a las columnas o sustrato orgánico que es de 34.05 y para calcular F crítica, se calculan los grados de libertad para las columnas y filas con un nivel de significancia del 5 % teniendo en el numerador 2 y en el denominador 3, siendo F crítica 6,94.

Teniendo los valores de F de prueba y F crítico se toma la decisión, para ello se conoce que en las filas F de prueba es 12,79 y F crítico es 6,94, estando fuera de la región de aceptación, de esta manera, se rechaza la H_0 y aceptando la H_1 que la concentración de esporas producidas a 20 °C, 25 °C y 30 °C no es igual.

En las columnas F de prueba es 34,05 y F crítico 6,94, se rechaza la H_0 y se acepta la H_1 que establece que la concentración de esporas producidas en cada sustrato orgánico no es igual.

4.4.3 Prueba de Tukey.

Para determinar en qué sustrato orgánico y a qué temperatura existe una mayor concentración de esporas de *Trichoderma* spp. se realiza la prueba de Tukey, y se obtienen los siguientes resultados.

Tabla 16. Comparación de sustrato orgánico en la concentración de esporas aplicando la prueba de Tukey

SUSTRATO ORGÁNICO	N	Media	Agrupación	
S1	3	655000000	A	
S2	3	428333333		B
S3	3	350666667		B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Fuente: Autor

De acuerdo con la Tabla 16, con el ordenamiento de las medias de los tres sustratos utilizados para la propagación de *Trichoderma* spp. se definieron dos categorías. Categoría «A» mejor producción de esporas correspondiéndole a la cáscara de naranja, y la categoría «B» menor producción de esporas correspondiente a la tusa y hoja de maíz.

Para determinar la temperatura a la cual existe una mayor concentración de esporas se obtienen los siguientes resultados.

Tabla 17. Comparación de temperatura en la concentración de esporas aplicando la prueba de Tukey

TEMPERATURA	N	Media	Agrupación	
T3	3	572333333	A	
T2	3	483000000	A	B
T1	3	378666667		B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Fuente: Autor

De acuerdo con la Tabla 17, con las medias de las tres temperaturas utilizadas, se define dos categorías. Categoría «A» mejor temperatura para producción de esporas siendo 30 °C y la categoría «B» temperatura en la que existe menor producción de esporas a 20 °C.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- De los sustratos que se utilizaron para la captura de *Trichoderma* spp. nativo, la mejor trampa nutricional es el arroz precocido por su alto contenido en almidón, se demostró preferencia nutricional.
- Se aisló al hongo antagonista *Trichoderma* spp., en el cantón Sígsig, el mismo que fue caracterizado tanto macroscópica como microscópicamente, y comparado con un hongo proveniente de Ecocycle Biotech S. A.
- El hongo antagonista *Trichoderma* spp. es muy versátil y de fácil manipulación, tiene la capacidad de adaptarse a diferentes temperaturas y desarrollarse en varios sustratos orgánicos.
- Se determina que la cáscara de naranja, tusa de maíz y hoja de maíz cumplen con las necesidades nutricionales para la propagación *Trichoderma* spp. por lo que se puede reemplazar el uso del arroz como sustrato.
- Se determina que la mejor concentración de esporas se da al octavo día a 30 °C en la cáscara de naranja teniendo 7.69×10^8 ufc/mL.
- La concentración de esporas al octavo día a 30 °C de la tusa es 5.37×10^8 ufc/mL y de la hoja de maíz 4.11×10^8 ufc/mL.
- El análisis comparativo realizado por el método de Tukey para los resultados obtenidos, indica que la cáscara de naranja a 30 °C tiene un alto grado de producción de esporas de *Trichoderma* spp.
- Las concentraciones obtenidas son ideales para ser utilizadas en las aplicaciones de campo, sabiendo que para utilizar este hongo tanto en invernadero como en campo son necesarias concentraciones a partir de 1×10^6 a 1×10^8 esporas/mL lo que indica que se utilizará en cantidades mínimas los sustratos estudiados.
- Los resultados de esta investigación constituye un aporte para la implantación de sustratos locales para la producción a gran escala de biopreparados de cepas nativas de *Trichoderma* spp.

DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación se acepta la hipótesis planteada que establece que si el hongo el *Trichoderma* spp. se desarrolla en un sustrato orgánico, entonces se podría utilizar para su reproducción.

Según la bibliografía consultada se determina que existen estudios en donde se aísla el *Trichoderma* spp. para utilizar como controladores biológicos y evitar el uso indiscriminado de agroquímicos, usando cepas de microorganismos nativos, teniendo como vínculo Guilcapí Ávalos (2016) quien aísla el *Trichoderma* spp. de una muestra de suelo e inocula en agar PDA, posteriormente determina su identidad por secuenciación de ADN; mientras que en esta investigación se aísla colocando trampas de arroz precocido en el suelo y su identidad se determina comparando características microscópicas y macroscópicas con un hongo *Trichoderma* spp. proveniente por Ecocycle Biotech S. A.

De acuerdo con algunos estudios se evalúan sustratos orgánicos para propagación de *Trichoderma* spp. con el objetivo de reemplazar el grano de arroz entero de buena calidad, teniendo como referencia a los autores Arévalo *et al.* (2017) quienes utilizan como sustratos los residuos agrícolas de cascarilla de arroz entera y molida, cáscara de maní como fuentes nutritivas teniendo un rendimiento superior a $1,10 \times 10^8$ conidios/mL de sustrato en los residuos agrícolas que fueron mezclados con Ñelen.

Mientras que Michel Aceves, Otero Sánchez, Martínez Rojero, & Rodríguez Morán (2008) evalúan quince sustratos orgánicos: cáscara de tomate (cáliz maduro acrescente de la flor, que encierra al fruto), arroz (glumas, lemas y palea de la flor), ajo (catáfilas coriáceas), cacao (testa de la semilla), ajonjolí (pericarpio del fruto), cacahuete (pericarpio del fruto), café (pericarpio del fruto), vaina de frijol (pericarpio del fruto), olote de maíz (raquis de la inflorescencia femenina), granos de arroz, sorgo, alpiste y maíz, rastrojo de soya y maíz, siendo el olote el mejor sustrato con una concentración de 4.43×10^8 conidias/mL.

En tanto que Agamez Ramos, Zapata Navarro, Oviedo Zumaque, & Barrera Violeth (2008) utilizan semillas de *Artocarpus incisa* (fruta de pan) y desechos agroindustriales como cascarilla de arroz y algodón teniendo la mejor producción de esporas en el sustrato compuesto por cascarilla de algodón (enriquecida con soluciones de melaza) y semillas de *Artocarpus incisa* con una concentración de $2,1 \times 10^8$ conidios/mL, y $8,38 \times 10^8$ conidios/mL.

Las tres investigaciones citadas anteriormente evalúan diferentes sustratos orgánicos, al igual que en esta investigación en la que se utiliza la cáscara de naranja, tusa y hoja de maíz. Obteniendo la mejor concentración en la cáscara de naranja con un valor de $7,69 \times 10^8$ conidias/mL.

Según la producción de conidias/g el mejor sustrato es el que menciona Agamez Ramos, Zapata Navarro, Oviedo Zumaque, & Barrera Violeth (2008) de semillas de *Artocarpus incisa* con $8,38 \times 10^8$ conidios/mL, pero esta semilla se utiliza en la industria alimentaria por lo que no se recomienda utilizarla para propagar *Trichoderma spp.*, de esta manera, el sustrato adecuado para propagación del hongo en estudio es la cáscara de naranja con $7,69 \times 10^8$ conidias/mL.

Para determinar cuál es el mejor sustrato orgánico para propagar *Trichoderma spp.*, se evalúa el número de conidias/mL como sostiene Arévalo *et al.* (2017), Michel Aceves, Otero Sánchez, Martínez Rojero, & Rodríguez Moran (2008) y Agamez Ramos, Zapata Navarro, Oviedo Zumaque, & Barrera Violeth (2008), concordando sus estudios con la presente investigación.

Según las investigaciones consultadas, se determina que la temperatura influye en la propagación de *Trichoderma spp.*, como lo señala la autora Endara Borja (2009) al comparar las curvas de crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* en los diferentes sustratos orgánicos, la temperatura óptima para el desarrollo es de 30 °C, y en la presente investigación se concluye que a 30 °C existe mayor producción de esporas en los tres sustratos, siendo el mejor la cáscara de naranja.

RECOMENDACIONES

- En la provincia del Azuay, cantón Sígsig, es preciso innovar con procesos que lleguen al sector agrícola con insumos de excelente calidad, siendo amigables con el medioambiente sin afectar la salud de sus pobladores, que no desgasten el suelo y sean económicamente factibles. Durante esta investigación se ha aislado un hongo antagonista *Trichoderma* spp., pudiendo aprovecharse todo su potencial para la producción de bioinsumos destinados al control de fitopatógenos de diversos cultivos de la zona, minimizando así la utilización exagerada de agroquímicos.
- Estudiar más sustratos orgánicos que pudieran cumplir con las necesidades nutricionales del *Trichoderma* para su propagación.
- Aplicar el *Trichoderma* spp., en el campo para realizar pruebas de efectividad y comprobar las ventajas de la aplicación de este hongo en diferentes cultivos.
- Realizar un análisis costo-beneficio para determinar que sustrato es el menos costoso, valorando también su concentración conidios/mL.
- Incubar a 30 °C ya que demuestra mejor producción de conidios/mL.

Referencias bibliográficas

- Acosta Toro, Ó. A. (2015). Comportamiento de *Trichoderma* sp., bajo diferentes condiciones de laboratorio. *Universidad Técnica de Ambato*.
- Agamez Ramos, E. Y., Zapata Navarro, R. I., Oviedo Zumaque, L. E., & Barrera Violeth, J. L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Colomb. Biotecnol*, 23-24.
- Agosin, E. (1997). Effect of culture conditions and spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 13, 225-232.
- Agosin, E., Muñoz, G., San Martín, R., & Crawford. (2014). Effect of culture conditions and spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 225-232.
- Albán, D., & Freire, D. (2009). OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE NARANJA “*Citrus sinensis*” VENIENTES DEL PROCESO AGROINDUSTRIAL EN LA PROVINCIA DE BOLIVAR. *ESPE*, 68.
- Alvarado Gualoto, M. E., & Olives Erazo, A. C. (2013). *Identificación del potencial aprovechable de los residuos sólidos orgánicos que se generan en mercados, supermercados, parques, jardines y diferentes sectores industriales de la zona sur del distrito metropolitano de Quito*. From Universidad Politécnica Salesiana: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5787/1/UPS-ST001054.pdf>
- Árbito, M. (2017). *Universidad Politécnica Salesiana*.
- Arcos Plazas, M. D. (2011). Obtención y evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el biocontrol de *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosas. (tesis). *Escuela Politécnica del Ejército*.
- Arevalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigos, E., Costa, B., & Leon, B. (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. *Investigación Altoandina*, 135-144.
- Argumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, F., & Peña, J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Internacional de la Contaminación Ambiental*, 257-269.
- Argumento Delira, R., Alarcón, A., Ferrera Cerrato, R., & Peña Cabriales, J. P. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Int. Contam, Ambient.*, 257-269.
- Arroyo, O., & G, A. (2004). *Sistema de Bibliotecas SISBIB*. From Producción de enzimas pectinasas por Actinomicetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibVirtual/tesis/Salud/Arroyo_O_A/cap2.htm
- Ávila Cubilos, C., Goretta Ramírez, M., & Lizcano Toledo, R. (2014). Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial la Angostura de Campoalegre (Huila). *Centro de formación Agroindustrial*, 6.
- Bastidas, O. (n.d.). *Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting*. Retrieved October 14, 2017 from <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
- Belanger, R., Dufour, N., Caron, J., & Benhamon, N. (2015). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Sci techol*, 41-54.

- Benites Benillo , C. M., & Carina Marroquín , L. (2013). Produccion de Trichoderma Harzianum en diferentes sustratos orgánicos. *Portal de la Ciencia*.
- Benites, T., & Rincón, A. (2004). *Mecanismos de biocontrol de Trichoderma*.
- Caro, N., & Frank, A. R. (1929). Procesos para la producción de fertilizantes orgánicos nitrogenados por procesos de amoxidación. *British patent application*.
- Castro , R., Pesántez , M., Flores, V., Díaz , C., Castro, L., & Alvarado Capó, Y. (2015). Efecto de la cepa ecuatoriana de Trichoderma harziaunum Rifai como antagonista de Mycosphaerella fijiensis Morolet en condiciones de casa de cultivo. *Proteccion Vegetal*, 133-138. From <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30n2/rpv07215.pdf>
- Castro A., M. (2016). Rendimientos de arroz en cáscara segundo cuatrimestre 2016. *MAGAP*, 1-8. From http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/rendimiento_arroz_segundo_quatrimestre2016.pdf
- Castro, L., Gavi, R., Peña Cabriales, J., Núñez, E., & Etchevers, B. (2006). Eficiencia de recuperación de N y K de tres fertilizantes de lenta liberación. *Terra Latinoamericana*, 277-282.
- Chet, I., Ibar, J., & Hadar, I. (2012). Fungal antagonistic and mycoparasites. In: Wick Low, D.T. y Soderstrom, B. (eds.). *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer Verlag, 165-192.
- CIMMYT. (1995). Manejo de los ensayos e informes de los datos para el Programa de Ensayos Internacionales de Maíz.
- Coca, J., Álvarez, R., & Fuertes, B. (1984). Production of a nitrogenous humic fertilizer by the oxidation-ammoniation of lignite. *Prod. Res. Dev*, 620-624.
- Cook, R., & Baker, K. (1989). The nature of practice of Biological Control of Plant Pathogens.
- Córdoba , J. A., Salcedo , E., Rodríguez, R., Zamora , J. F., Manríquez , R., Contreras , H., . . . Delgado , E. (2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Latinoamericana de química*, 171 - 175.
- Córdoba, A., Delgado, F., & Toriz, G. (2010). Generación de compuestos orgánicos en el elote, mediante la oxidación en húmedo. *Investigación, Biodiversidad y Desarrollo*, 186-200.
- Elad, I., Zimand, G., Zags, I., Zuriel, S., & Chet, I. (2013). Use of Trichoderma harzianum in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (Botrytis cinerea) under commercial greenhouse conditions. *Plant pathology*, 324-332.
- Encalada Ríos, E. (2016). Evaluación de dos especies de Trichoderma para el manejo de enfermedades fúngicas que afectan al cultivo del tomate (Solanum lycopersicum Mill) a nivel radicular en condiciones de invernadero. *Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias*.
- Endara Borja, M. Á. (2009). Reproducción del hongo trichoderma harzianum (biofungicida) aprovechando desechos agroindustriales (residuos de papa, tamo de fréjol, bagazo de caña). *Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales*.
- Erazo Arias, J. P. (n.d.). *Agricultura Orgánica*. From Aplicación de microorganismos promotores de la descomposición de los residuos de cosecha y promotores del crecimiento vegetal en caña de azúcar: http://www.controlbiologico.com/propuesta_cana.htm

- Essilfie, R. (1985). Protein Upgrading of Orange Peel Waste for Stock Feed by Solid Substrate Fermentation. *Faculty of Food and Environmental Sciences of University of Western Sydney, Hawkesbury*, 16-17.
- FAOSTAT. (2012). From Food and Agriculture Organization of United Nations: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Fernández, O., & Vega, I. (2001). Microorganismos en el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas*, 96-100.
- Flores Buitrón, C. S. (2016, Noviembre). From Universidad Central del Ecuador: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/8042/1/T-UCE-0013-Ab-390.pdf>
- Flores, D. (2001). Guía Práctica N.º 2 Para el aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos.
- Gato, Y., & Rodríguez, D. (2010). Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad*, 241-246.
- Gómez Bolívar, T. M. (2017). Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de *Trichoderma* spp mediante fermentación en líquido y sólido. *Respositorio Tecnológico de Costa Rica*, 1-88.
- González, M., Rieumont, J., Quintana, I., Rodríguez, C., Cuesta, C., Sardinas, C., & Morales, A. (2006). Obtención de un material polimérico mejorado empleado como recubrimiento para la obtención de fertilizantes de liberación lenta. *Congreso Iberoamericano de Metalurgia y Materiales, Habana-Cuba*, 655-660.
- Guilcapí Ávalos, V. G. (2016). Determinación de la estabilidad y viabilidad de *Trichoderma harzianum* Rifai en cinco sustratos usados para la elaboración de un biofungicida en formulación líquida. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*.
- Harman, G., & Kubicek, C. (2008). *Trichoderma and Gliocladium*. London: Taylor and Francis, 25-40.
- Humeres Valenzuela, C. A. (2004). Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre aislados de hongos Basidiomycetes asociados a muerte de brazos en Kiwi. *Universidad de Talca. Facultad de Ciencias Agrarias de Escuela de Agronomía*, 23-24.
- Hurter, W. R. (1997). Nonwood plant fiber uses in papermaking. Hurter Consult Incorporated. *Agricultural Residues*.
- Irimia Hernández, M., Rodríguez Hernández, A., & Castellanos Gonzáles, L. (2016). Niveles de humedad, cepa y cantidad de sustrato arroz entero para la reproducción de *Trichoderma* spp. *Agrosistema*, 40-47.
- Jimenez Mata, E. A. (2014). *Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro*. From Sinergismo de Conidios y Extractos de Crecimiento de Hongos Entomopatógenos sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4348/T19297%20RAMIREZ%20BUENDIA,%20ROBERTO%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
- Juárez, E. (2014). Análisis de productos fermentados - microdealimentos.
- Kabel, M., Zeevalking, J., Voragen, A., & Schols, H. (2007). Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw*, 98.
- Kato Yamakake, T. Á., Mapes Sánchez, C., Mera Ovando, L. M., Serratos Hernández, J. A., & Bye Boettler, R. A. (2009). *Origen y diversificación del Maíz*. Coyoacán: Impresora Apolo.

- Knob, A., & Cano, C. (2010). Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: A novel acidophilic xylanase. *Biochem Biotechnol*, 429 - 443.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Veg*, 1-11.
- Martínez Fernández, M. (2012). Evaluación de tres cepas de *Trichoderma* spp., como alternativa de biocontrol como *Phytophthora capsici* L. en plántulas de pimiento morrón bajo invernadero. *CIIDIR "Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo Integral regional"*.
- Martínez, G., Zúñiga, V., Delgado, E., Camacho, A., González, V., & Allan, G. (1992). Producción de fertilizantes nitrogenados mediante oxiamonificación en corteza de pino en lecho fluidizado. *Tecnol. Ciencia Ed*, 21-26.
- Michel Aceves, A. C., Otero Sanchez, M. A., Martínez Rojero, R. D., & Rodríguez Moran, N. L. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Chapingo Serie Horticultura*, 185-191.
- Minchala Valencia, T. P., & Moreira Bustamante, V. A. (2007). Proyecto de inversión para la elaboración de bioproductos con microorganismos para el control de las enfermedades de las plantas. *Escuela Superior Politécnica de Litoral*, 179.
- Moore, E. (2011). Fundamentals of the Fungi. *Prentice Hall*, 574.
- Mora-Ravelo, S., Gavi, F., Peña, C., Pérez, M., Tijera, C., & Vaquera, H. (2007). Desnitrificación de un fertilizante de liberación lenta y urea + fosfato monoamónico aplicados a trigo irrigado con agua residual o de pozo. *Int Contam. Ambie*, 25-33.
- Moreno Aguirre, B. (2014). Rendimientos de arroz en el Ecuador. Primer cuatrimestre del 2014. *MAGAP*.
- Moya Sánchez, C. J. (2014). Diseño y construcción de una máquina deshojada de maíz seco, que partiendo de la mazorca con su envoltura, entregará como producto, la mazorca y como subproducto, la envoltura de maíz. *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*, 1-6.
- Moya, J., García, S., Avilés, E., Andújar, F., & Núñez, P. (2014). Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana. *APF*, 11-16.
- Muñoz, A. (2010). *Agrytec*. From Agricultura orgánica en el Ecuador: http://www.agrytec.com/agricola/index.php?Itemid=22&id=3578:agricultura-organicaen-el-ecuador&option=com_content
- Nolasco Guzmán, V. (2010, Mayo). *SlideShare*. From Manual técnico para la producción de *Trichoderma* spp., como funguicida biológico en la sociedad cooperativa "Equipo de com posteso de Atlixco" Ecomatlix S.C. de R.L. de C.V., en Atlixco, Puebla : <https://es.slideshare.net/tobystone1983/2-manual-tecnicotrichoderma>
- Oliveira, E., Silva, A., Nagashima, T., Salgado, G., Aguilar, L., Rodrigues, M., . . . Tabosa, E. (2010). Xylan from corn cobs, a promising polymer for drug delivery: Production and characterization. *Bioresource Technolo*, 5402 - 5406.
- Orozco Santos, M., Orozco Romero, J., Pérez Zamora, O., Manzo Sánchez, G., Farías Larios, J., & da Silva Moraes, W. (2008). Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos. *Tropical Plant Pathology*, 189-196.
- Papavizas, G. (2011). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Phytopathol*, 23-54.
- Perdomo, A. (1995). Protocolos para la producción y uso de microorganismo beneficios en condiciones rurales. *Bogota Positiva*, 1-27.

- Poalacín, C. (2015). Estudio del adecuado crecimiento del hongo *Trichoderma harziaunum* y *Trichoderma hamatum* en sustrato sólido. *Universidad Central del Ecuador - Facultad de Ingeniería Química*, 12.
- Prado Martínez, M., Anzaldo Hernández, J., Becerra Aguilar, B., Palacios Juárez, H., Vargas Radillo, J. d., & Rentería Urquiza, M. (2012). Caracterización de hojas de mazorca de maíz y de bagazo de caña para la elaboración de una pulpa celulósica mixta. *Madera bosques*, 37-51 .
- proceso de fermentación sólida para la producción de Trichoderma spp. a partir de los residuos agroindustriales cascarilla de arroz (Oriza sativa) y residuos de papa (Solanum tuberosum)*. (n.d.).
- Radlein, A., Piskorz, J., & Majerski, P. (1997). Method of producing slow release nitrogenous organic fertilizer from biomass. *Canada patent application*.
- Roble Olivo, A., Noé Aguilar, C., & Montañez Sáenz, J. C. (2012). Uso del olote de maíz como sustrato microbiano para la obtención de xilanasas. *Univesidad Autónoma*, 1-7. From <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/7.html>
- Robledo Olivo, A., Noé Aguilar, C., & Montañez Sáenz, J. C. (2014). Uso de olote de maíz como sustrato microbiano para la obtención de xilanasas. *Científica de la Universidad Autonoma de Coahuila*.
- Samanta, A. K., Seniana, S., Kolte, A., Sridhara, M., Sampatha, K. T., Jayapala, N., & Devia, A. (2012). Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. *Food Bioprod. Process*, 466-474.
- Serpa Barahona, M. J. (2015). Eficiencia de crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai para la producción de bioplaguicida aprovechando el residuo agroindustrial de cáscara de haba (*Vicia faba* L.). *DSPACE - ESPOCH*, 69. From <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4864/1/236T0167.pdf>
- Silvana Santana, D. A. (2014). *Estudio técnico-económico para la creación de una empresa que elabore harina de arroz y soya como alimento infantil en la ciudad de Guayaquil*. From <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/6707/1/TESIS%20%20SILVA%20SANTANA%20%20DANIEL%20ANTONIO.pdf>
- Simón, O., Sinhg, B., & Weil, M. (2005). Elaboración y caracterización de lignosulfonatos amonificados a partir de pinzote de banano y aserrín de laurel (*Cordia alliodora*) para utilizarse como fertilizante de liberación lenta. *EARTH-Tierra Tropical*, 21-26.
- Sivila, N., & Álvarez Jujuy, S. (2013). *Producción artesanal de Trichoderma*. From file:///C:/Users/Aracely/Downloads/documentop.com_produccion-artesanal-y-control-de-calidad-del-hong_5a17cf951723dddbc90fb2c9.pdf
- SPSS, P. n. (2017, Julio 23). *Pruebas de normalidad*. From https://previa.uclm.es/actividades0708/cursos/estadistica/pdf/descargas/SPSS_PruebasNoParametricas.pdf
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., & Coronado, M. F. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp* para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Fac Agronómica*, 509-516.
- Toledo Álvarez, M. (2008). Residuos de maíz y quinua como potenciales sustratos para el cultivo de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus*. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*, 22.
- Tovar Castaño, J. C. (2008). Evaluación de capacidad antagonista «in vivo» de aislamientos de *Trichoderma spp* frente al hongo fitopatógeno *Rhizoctinia solani*. *Pontificia Universidad Javeriana*. From <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>

- Troya, C., & Vaca Granda, L. (2014). *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca*. From Protocolo para la reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en Laboratorios Artesanales .
- Vallejo , T. (2014). Caracterización y clasificación de *Trichoderma* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio. *Universidad Técnica de Ambato* , 256.
- Vallejo Illijama, M. T. (2014). Caracterización y clasificación de *Trichoderma*s nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal. *Universidad Técnica de Otavalo*, 118. From <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/7691/1/tesis-026%20Maestr%C3%ADa%20en%20Agroecolog%C3%ADa%20y%20Ambiente%20-%20CD%20256.pdf>
- Vázquez Gálvez, G., Flores Magallón , R., & Ceja Torres , L. F. (2014). Evaluación de biofertilizantes líquidos en la producción de elote y grano en maíz. *Ecucba*, 15-20 .
- Velásquez, O., Ortegón, A., Camacho, A., Giles, M., Palao, M., & Serrano , B. (2009). *Cuenca en placa de bacterias*. From Facultad de Química, UNAM: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf
- Villarreal Villota, L. E. (2015). Estudio del adecuado crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma hamatum* en sustrato sólido. *Universidad Central del Ecuador*, 1-11.
- Yumbay Yallica, R. (2011). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp., en el control de *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosas (tesis). *Escuela Politécnica del Ejército*. From <file:///D:/Aracely/Documents/Documents/UNIVERSIDAD/TESIS/uso%20tesis/Evaluacion%20de%20cepas%20de%20Trichoderma%20spp,%20en%20el%20control%20de%20Botrytis%20cinerea%20en%20el%20cultivo%20de%20rosas..pdf>