



Obtención de un bioproducto a partir de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para su aplicación como agente de control biológico y potenciador del crecimiento de *Capsicum chinense*.

Cajamarca Asqui, Adriana Estefanía

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería
en Biotecnología

Bqf. Urbina Salazar, Anabell del Rocío Ph. D.

24 de agosto del 2023

Reporte de verificación de contenido



Cajamarca_Adriana_Trabajo_Integrac...

Scan details

Scan time: August 29th, 2023 at 15:43 UTC
 Total Pages: 86
 Total Words: 21305

Plagiarism Detection



AI Content Detection



Plagiarism Results: (7)

- Diferencia entre fermentación en estado sólido y fe...** 0.5%

<https://es.strephonsays.com/solid-state-fermentation-and-s...>

John Pratt
 strephonsays Casa Tecnología Otro Vida Ciencias Diferencia entre fermentación en estado s...
- CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE Trichoderma spp. NATI...** 0.5%

https://www.scielo.org/mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=...

Servicios Personalizados Revista SciELO Analytics Google Scholar HSM5 ...

Firma:



Bqf. Urbina Salazar, Anabell Del Rocio Ph.D

C.C.: 180415421-7

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "**Obtención de un bioproducto a partir de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para su aplicación como agente de control biológico y potenciador del crecimiento de *Capsicum chinense***" fue realizado por la señorita **Cajamarca Asqui, Adriana Estefanía**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 24 de agosto del 2023

Firma:



Bqf. Urbina Salazar, Anabell Del Rocio Ph.D

C.C.: 180415421-7

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Cajamarca Asqui, Adriana Estefanía**, con cédula de ciudadanía N°1720177276, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Obtención de un bioproducto a partir de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para su aplicación como agente de control biológico y potenciador del crecimiento de *Capsicum chinense*”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 24 de agosto del 2023

Firma

Cajamarca Asqui, Adriana Estefanía

C.C.: 172017727-6



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Cajamarca Asqui, Adriana Estefanía**, con cédula de ciudadanía N° 1720177276, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Obtención de un bioproducto a partir de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para su aplicación como agente de control biológico y potenciador del crecimiento de *Capsicum chinense*"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Santo Domingo, 24 de agosto del 2023

Firma

Cajamarca Asqui, Adriana Estefanía

C.C.: 172017727-6

Dedicatoria

El presente trabajo va dedicado con mucho cariño a mis padres, Eduardo Cajamarca y Cecilia Asqui, quienes me dieron la vida y me han apoyado incondicionalmente durante todo este tiempo para culminar esta etapa en mi vida.

A mis hermanas, Evelyn y Camila, quienes me han demostrado su apoyo y cariño sincero en todo momento. A mis fieles compañeras, Sheyla y Hannie, quienes son parte de la familia y de mi corazón.

A todos mis familiares y amigos, quienes han estado presentes en cada etapa de mi formación y que de alguna u otra manera me han brindado su apoyo a lo largo de este viaje

Agradecimiento

Primero agradezco a Dios y a la vida por permitirme seguir cumpliendo mis metas, a mis amados padres, quienes con su sacrificio y esmero me han permitido seguir adelante con mis estudios, agradezco que a pesar de las adversidades han estado presentes en cada etapa de mi vida brindándome su amor, paciencia y consejos que me han permitido llegar hasta donde estoy.

A mis queridas hermanas, quienes creen en mí y me apoyan cada que lo necesito, a mis mascotas, Sheyla y Hannie, por su presencia reconfortante y ser quienes me llenan de alegría.

De igual manera, agradezco a Deivis Alejandro, por ser esa persona incondicional y paciente que me ha brindado todo su apoyo en los buenos y malos momentos. A mis compañeros y amigos, Deivis T., Brandon V., José Luis Z., Kassandra H., Diana H., Diana M., quienes han estado presentes en esta etapa y me han brindado su apoyo de alguna manera.

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por darme la oportunidad de estudiar y formarme profesionalmente, y a todos los docentes que han sido parte de mi formación académica.

Contenido del índice

Caratula.....	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Contenido del índice	8
Índice de Tablas.....	16
Índice de Figuras	18
Resumen.....	19
Abstract	20
Capítulo I.....	21
Introducción.....	21
Justificación.....	24
Objetivos	26
Objetivo General	26
Objetivos específicos	26
Hipótesis	27
Hipótesis para Factor A.....	27

Hipótesis para Factor B.....	27
Hipótesis para Factor C.....	27
Capítulo II.....	28
Revisión bibliográfica.....	28
<i>Trichoderma</i> spp.....	28
Taxonomía <i>Trichoderma</i> spp.....	28
Aspecto macroscópico.....	28
Aspecto microscópico.....	29
Condiciones de crecimiento	30
Temperatura.....	30
Humedad:.....	30
Aireación:.....	31
pH:.....	31
Tamaño de partícula del sustrato:	31
Exposición de luz:	32
Esporulación:.....	32
Germinación:.....	32
Salinidad:.....	32
Necesidades nutricionales:.....	33
Aplicaciones de <i>Trichoderma</i> spp.	33
Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.....	33

	10
Competencia	34
Micoparasitismo	34
Antibiosis	35
Biocontrol con <i>Trichoderma</i> spp.....	35
Interacción <i>Trichoderma</i> -Planta	36
Fermentación	36
Fermentación sumergida	37
Fermentación sólida.....	37
Contaminación por residuos agroindustriales	38
Sustratos	38
Residuos sólidos orgánicos	38
Residuos de cosecha.....	38
<i>Trichoderma</i> en la producción de AIA.....	39
Ácido indol-3-acético (AIA)	39
Métodos para determinar AIA.....	40
Determinación colorimétrica de Salkowski	40
Familia <i>Capsicum</i> spp.	40
Especies cultivadas en Ecuador.....	41
Enfermedades.....	41
<i>Capsicum chinense</i>	41
Cultivo <i>in vitro</i>	42

	11
Hongos fitopatógenos.....	42
<i>Fusarium</i> spp.....	42
Agroquímicos convencionales.....	43
Desventajas de los agroquímicos convencionales.....	43
Bioproducto.....	44
Capítulo III.....	46
Metodología.....	46
Ubicación del área de investigación.....	46
Ubicación política.....	46
Ubicación ecológica.....	46
Ubicación geográfica.....	46
Materiales.....	47
Muestreo del suelo.....	47
Aislamiento y siembra del microorganismo.....	48
Purificación del hongo <i>Trichoderma</i> spp.....	48
Identificación del microorganismo.....	49
Tinción de azul de metileno.....	50
Tinción de azul de lactofenol.....	51
Fermentación en sustratos orgánicos.....	51
Preparación de Medio Mínimo Enriquecido (MME).....	52
Obtención de los sustratos orgánicos.....	53

Preparación de medios	53
Preparación del buffer para la inoculación de <i>Trichoderma</i> en los medios de cultivo.....	54
Inoculación del hongo <i>Trichoderma spp.</i> en los medios de cultivo.....	54
Incubación de los medios de cultivo	55
Toma de muestras de los medios de cultivo en fermentación.....	55
Evaluación de la biomasa producida	56
Preparación del reactivo de Biuret y cuantificación de proteínas	56
Detección de Ácido indol acético (AIA).....	57
Obtención del bioproducto	58
Evaluación del bioproducto en un cultivo <i>in vitro</i> de <i>Capsicum chinense</i>	58
Evaluación del efecto antagonista de <i>Trichoderma spp.</i> frente a <i>Fusarium spp.</i>	59
Métodos	59
Muestreo del suelo.....	59
Aislamiento y siembra del microorganismo	60
Purificación del hongo <i>Trichoderma spp.</i>	60
Identificación del microorganismo	61
Tinción de azul de metileno	61
Tinción de azul de lactofenol	61
Fermentación	61
Preparación Medio Mínimo Enriquecido (MME)	61
Obtención de los sustratos orgánicos.....	62

Preparación de medios	62
Preparación del buffer para la inoculación de <i>Trichoderma</i> en los medios de cultivo.....	62
Inoculación del hongo <i>Trichoderma spp.</i> en los medios de cultivo.....	62
Incubación de los medios de cultivo	63
Toma de muestras de los medios de cultivo en fermentación.....	63
Evaluación de la biomasa	63
Preparación del reactivo de Biuret y cuantificación de proteínas	63
Detección de Ácido indol acético (AIA).....	65
Obtención del bioproducto	67
Evaluación del bioproducto en un cultivo <i>in vitro</i> de <i>Capsicum chinense</i>	68
Evaluación del efecto antagonista de <i>Trichoderma spp.</i> frente a <i>Fusarium spp.</i>	68
Diseño experimental	70
Factores y niveles de estudio para la obtención del bioproducto	70
Tratamientos a comparar para la obtención del bioproducto.....	70
Tipo de diseño para la obtención del bioproducto.....	72
Capítulo IV	73
Resultados	73
Obtención del microorganismo	73
Purificación de <i>Trichoderma spp.</i>	74
Identificación macroscópica de <i>Trichoderma spp.</i>	75
Identificación microscópica de <i>Trichoderma spp.</i>	76

	14
Cuantificación de proteínas mediante el método de Biuret.....	77
Detección de ácido indol acético (AIA) mediante el reactivo de Salkowski.....	78
Análisis de varianza	79
Biomasa.....	79
Proteínas.....	80
Ácido indol acético.....	81
Prueba de significancia de Tukey para Factor A (Tipo de fermentación).....	82
Prueba de significancia de Tukey para Factor B (Tipo de sustrato).....	84
Prueba de significancia de Tukey para Factor C (Día de medición)	86
Prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0.05$) para Interacción A*B*C (Tipo de fermetación*Tipo de sustrato*Días de medición).....	88
Evaluación del producto en cultivo <i>in vitro</i> de <i>Capsicum chinense</i>	91
Evaluación del efecto antagonista de la cepa nativa de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Fusarium</i> spp.....	93
Capítulo V	95
Discusión.....	95
Respecto a la muestra de suelo y la importancia de una cepa nativa.....	95
Respecto a la siembra, purificación e identificación.....	96
Respecto al medio de cultivo	97
Respecto a los sustratos utilizados	98
Respecto a las fermentaciones evaluadas.....	98
Respecto a la mejor fermentación con <i>Trichoderma</i> spp.....	99

Respecto a las condiciones de la fermentación en estado sólido	100
Respecto a las variables evaluadas	101
Respecto la evaluación del bioproducto en <i>Capsicum chinense</i>	103
Respecto al efecto antagónico de <i>Trichoderma</i> spp.....	104
Capítulo VI	106
Conclusiones.....	106
Recomendaciones	107
Capítulo VII	108
Bibliografía	108

Índice de Tablas

Tabla 1. Materiales utilizados en la toma de muestras de suelo	47
Tabla 2 Materiales, insumos y reactivos usados para la siembra del microorganismo.....	48
Tabla 3 Equipos, insumos y reactivos utilizados en la purificación de <i>Trichoderma</i> spp.....	49
Tabla 4 Equipos, insumos y reactivos utilizados en la identificación microscópica de <i>Trichoderma</i> spp. mediante tinción de azul de metileno	50
Tabla 5 Equipos, insumos y reactivos utilizados en la identificación microscópica de <i>Trichoderma</i> spp. mediante tinción de azul de lactofenol.....	51
Tabla 6 Equipos, insumos y reactivos utilizados para la elaboración del medio mínimo enriquecido (MME).....	52
Tabla 7 Equipos, insumos y reactivos utilizados para la obtención de sustratos orgánicos.	53
Tabla 8 Equipos, insumos, reactivos y muestras para la preparación de los medios.	53
Tabla 9 Equipos, insumos y reactivos para la preparación del buffer para la inoculación de <i>Trichoderma</i> en los medios de cultivo.....	54
Tabla 10 Equipos, insumos y reactivos para la inoculación de <i>Trichoderma</i> en los medios de cultivo.	54
Tabla 11 Equipos utilizados en la incubación de los medios de cultivo.....	55
Tabla 12 Equipos, insumos y muestras para la toma de muestras de los medios de cultivo en fermentación.	55
Tabla 13 Equipos, insumos y muestras para la evaluación de biomasa producida.	56
Tabla 14 Equipos, insumos, reactivos y muestras para la cuantificación de proteínas mediante Biuret.....	56
Tabla 15 Equipos, insumos, reactivos y muestras para la detección de ácido indol acético. ...	57
Tabla 16 Equipos, insumos, reactivos y muestras para la obtención del bioproducto	58

Tabla 17 Equipos, insumos, reactivos y muestras para la evaluación del bioproducto en el cultivo in vitro de <i>Capsicum chienense</i>	58
Tabla 18 Equipos, insumos, reactivos y muestras utilizados para el enfrentamiento de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Fusarium</i> spp.	59
Tabla 19 Valores de la curva patrón con BSA.....	64
Tabla 20 Valores de la curva patrón con Ácido indol acético.	66
Tabla 21 Factores de estudio que actúan en el proceso de obtención del bioproducto.	70
Tabla 22 Tratamientos a comparar en la obtención del bioproducto.....	70
Tabla 23 <i>Análisis de varianza para biomasa (Absorbancia)</i>	79
Tabla 24 <i>Análisis de varianza para proteínas totales (mg/mL)</i>	80
Tabla 25 <i>Análisis de varianza para ácido indol acético AIA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)</i>	81
Tabla 26 <i>Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Tipo de fermentación (Factor A)</i>	82
Tabla 27 <i>Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Tipo de sustrato (Factor B)</i>	84
Tabla 28 <i>Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Día de medición (Factor C)</i>	86
Tabla 29 <i>Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Interacción A*B*C</i>	88

Índice de Figuras

Figura 1	<i>Colonias de hongos del género Trichoderma spp.</i>	29
Figura 2	Aspectos microscópicos de las cepas del género Trichoderma spp.	30
Figura 3	<i>Estructura química del ácido indol acético</i>	39
Figura 4	<i>Mapa de ubicación geográfica del área de investigación</i>	47
Figura 5	<i>Curva de calibración de BSA (0 a 10 mg/ml)</i>	65
Figura 6	<i>Curva de calibración de Ácido indol acético (0 a 50 µg/mg)</i>	67
Figura 7	<i>Toma de muestras de suelo</i>	73
Figura 8	<i>Cultivo de la muestra de suelo en PDA</i>	73
Figura 9	<i>Proceso de obtención de la cepa pura de Trichoderma spp.</i>	74
Figura 10	<i>Morfología macroscópica y microscópica del hongo del género Trichoderma spp.</i> ..	75
Figura 11	<i>Morfología macroscópica y microscópica del hongo del género Trichoderma spp.</i> ..	76
Figura 12	<i>Proteínas totales por método de Biuret</i>	77
Figura 13	<i>Método colorimétrico para cuantificación de AIA con reactivo de Salkowski</i>	78
Figura 14	<i>Efecto del Factor A (Tipo de fermentación) sobre las variables</i>	82
Figura 15	<i>Efecto del Factor B (Tipo de sustrato) sobre las variables</i>	84
Figura 16	<i>Efecto del Factor C (Días de medición) sobre las variables</i>	86
Figura 17	<i>Prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0.05$) para Interacción A*B*C (Tipo de fermentación*Tipo de sustrato*Días de medición)</i>	89
Figura 18	<i>Porcentaje de germinación de semillas</i>	92
Figura 19	<i>Evaluación del bioproducto en semillas</i>	92
Figura 20	<i>Crecimiento de Fusarium spp.</i>	93
Figura 21	<i>Antagonismo de Trichoderma spp. frente a Fusarium spp.</i>	94

Resumen

Especies del género *Trichoderma* spp. son los microorganismos que más se aplican en la elaboración de bioproductos que tienen como finalidad realizar control biológico y promover el crecimiento de las plantas, esto se debe a que este hongo se establece en las raíces, en donde forma una barrera que evita el ataque de los fitopatógenos y al mismo tiempo promueve el crecimiento radicular. Es por ello que el objetivo de la investigación fue obtener un bioproducto a partir de una cepa nativa de *Trichoderma* spp., aplicando fermentación sólida y sumergida con cáscaras de cacao y bagazo de caña, para determinar su eficacia en un cultivo *in vitro* de *Capsicum chinense* y a la vez evaluar el efecto antagónico de la cepa obtenida, el desarrollo de la investigación se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Santo Domingo, en donde, se aisló e identificó la cepa de *Trichoderma* en base a las estructuras macroscópicas y microscópicas, en la obtención del bioproducto se propuso un diseño trifactorial AxBxC y pruebas de significancia de Tukey para evaluar las variables de biomasa, AIA y proteína, mediante el cual se determinó que la mejor fermentación para obtener AIA y proteína fue la fermentación en estado sólido con bagazo de caña al octavo día, en la cual se produjo $207,560 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ y $6,446 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. En la evaluación del bioproducto en un cultivo *in vitro* de semillas de *Capsicum chinense* se observó que la aplicación del mismo ayudó en la germinación de las semillas y en el aumento de pelos radiculares. Por otro lado, en la prueba de antagonismo se obtuvo que la cepa nativa de *Trichoderma* spp. inhibió un 61,43% del crecimiento radial de *Fusarium* spp. al décimo día, determinado que el antagonismo fue de clase 1, por ello se concluyó que, la cepa nativa es efectiva para realizar el biocontrol y para fermentar residuos agroindustriales ricos en lignocelulosa.

Palabras clave: *Trichoderma* spp., bioproducto, ácido indol acético, *Capsicum chinense*, biocontrol.

Abstract

Species of the genus *Trichoderma* spp. They are the microorganisms that are most applied in the elaboration of bio products whose purpose is to carry out biological control and promote plant growth, this is because this fungus establishes itself in the roots, there it forms a barrier that prevents attack of phytopathogens and at the same time promotes root growth. That is why the objective of the research was obtain a bio product from a native strain of *Trichoderma* spp., applying solid and submerged fermentation with cocoa husk and cane bagasse, to determine its effectiveness in an in vitro culture of chinense, and at the same time evaluate the antagonistic effect of the strain obtained , the development of the research was carried out in the facilities of the University of the Armed Forces ESPE Headquarters Santo Domingo, where, the *Trichoderma* strain was isolated and identified on macroscopic and microscopic structures, In obtaining the bioproduct, an AxBxC trifactorial design and Tukey's significance tests were proposed to evaluate the biomass, AIA and protein variables, which determined that the best fermentation to obtain AIA and protein was solid-state fermentation with cane bagasse on the eighth day, in which $207,560 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ and $6,446 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ were produced respectively. In the evaluation of the bioproduct in an in vitro culture of *Capsicum chinense* seeds, it was observed that the application of it helped in the germination of the seeds and in the increase of root hairs. On the other hand, in the antagonism test it was obtained that the native strain of *Trichoderma* spp. inhibited 61.43% of *Fusarium* spp. radial growth. On the tenth day, it was determined that the antagonism was class 1, therefore it was concluded that the native strain is effective to perform biocontrol and to ferment agro-industrial waste rich in lignocellulose.

Key words: *Trichoderma* spp., bioproduct, indole acetic acid, *Capsicum chinense*, biocontrol.

Capítulo I

Introducción

La Agricultura ha sido una de las ocupaciones más antiguas de la humanidad y funciona como un punto de conexión entre las plantas y los microorganismos asociados, generando una interacción compleja. Actualmente, se le está dando más relevancia a las técnicas agrícolas que son más amigables con el medio ambiente, sin dejar de lado la calidad de los productos (Gupta et al., 2022). El género *Capsicum* spp. abarca un gran número de especies cultivadas en todo el mundo, de las cuales, la mayor parte son hortalizas y especias de gran relevancia económica e importantes por su aporte nutricional (Islam et al., 2021). Los frutos se caracterizan por ser picantes, esto debido a la presencia de alcaloides, sobre todo capsaicina y dihidrocapsaicina. El contenido de capsaicina puede variar mucho en las diferentes especies de *Capsicum* spp., siendo *C. chinense* el genotipo con el contenido más alto de capsaicina reportado hasta el momento (Park et al., 2016).

Algunos de los métodos agrícolas modernos como la labranza extensiva, los monocultivos y el abuso de los agroquímicos afectan severamente la microbiota del suelo y por ende, la calidad del mismo (Wolińska et al., 2017). El control de plagas y enfermedades de manera convencional en la agricultura se basa principalmente en la aplicación de plaguicidas químicos sobre los cultivos, lo cual provoca efectos adversos sobre la salud y el agroecosistema (Woo et al., 2014). Aunque actualmente se busque una agricultura más orgánica, sostenible y con mayor conciencia, en los países en desarrollo se siguen utilizando pesticidas tóxicos y fertilizantes inorgánicos por encima de las dosificaciones sugeridas (Gupta et al., 2022). Esto se debe al desconocimiento de técnicas como el biocontrol de enfermedades y a que la agricultura está bajo presión debido a una creciente demanda de alimentos de una población que va en aumento y con recursos que rápidamente se agotan (Lew et al., 2020).

Los fitopatógenos provocan grandes pérdidas económicas en la agricultura, ya que son

los responsables de muchas enfermedades de las plantas. Principalmente, los hongos son los más perjudiciales debido a su agresividad y gran adaptabilidad.. Normalmente se suele realizar un control químico, pero el abuso de estos a lo largo de los años ha provocado que muchos fitopatógenos adquieran resistencia a muchos de estos plaguicidas (Benítez et al., 2004). El cultivo del género *Capsicum* spp. se puede ver afectado por una amplia variedad de enfermedades, lo cual limita mucho su producción. Sin embargo, los fitopatógenos que más destacan son el oomiceto *Phytophthora capsici*, principal responsable de la pudrición a nivel de la raíz, tallo y hojas, y fruto, el nematodo *Meloidogyne incognita* y la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, la cual provoca la mancha foliar bacteriana (Silvar y García-González, 2017).

El control biológico consiste en la utilización de organismos vivos con el fin de reducir o eliminar plagas. Es un método que no causa daños o graves impactos en la naturaleza y es sustentable (Zin y Badaluddin, 2020). Los microorganismos utilizados para el biocontrol tienen la capacidad de atacar a diversos patógenos. También ayudan a reducir el estrés abiótico y aliviar el estrés fisiológico, aumentando la absorción de nutrientes de la planta y mejorando la eficiencia del uso del nitrógeno en los cultivos (Shoresh et al., 2010).

Trichoderma spp. es el microorganismo más utilizado en el mundo para realizar control biológico de enfermedades en la agricultura, ya que se establece en la raíz de las plantas, sobre todo en la capa más externa de células de esta, formando una barrera que evita el ataque de patógenos (Zin y Badaluddin, 2020). Los hongos promotores del crecimiento vegetal, como *Trichoderma* spp., tienen la capacidad de estimular el crecimiento de la planta. En los cultivos agrícolas, esto se traduce en plantas que tienen un mejor desarrollo, mejor calidad de los productos y un aumento de la productividad. Algunos hallazgos muestran que *Trichoderma* spp. permite obtener cultivos con plantas más sanas y resistentes al estrés y ataque de fitopatógenos (Zin y Badaluddin, 2020).

Los residuos agrícolas tienen un gran potencial para ser aprovechados, y aunque actualmente la mayor parte se utilizan para realizar biocombustibles, estos se podrían utilizar con otros fines, reduciendo así la contaminación que los residuos podrían generar si solo son desechados sin aprovecharse (Kluts et al., 2019). Es por esto por lo que se plantea el aprovechamiento de residuos orgánicos utilizando un hongo del género *Trichoderma* spp., ya que estos pueden crecer en biomasa vegetal que contenga sacarosa, rafinosa, celulosa, quitina, inulina, almidón o pectina, y también puede crecer en sustratos más complejos como el suero de leche, hidrocarburos de petróleo e incluso en plaguicidas, gracias a la gran variedad de enzimas que puede producir. Esto se puede aprovechar en un proceso de fermentación, el cual consiste en la aplicación de un microorganismo a sustratos sólidos o líquidos para poder obtener algún tipo de producto de interés. Dependiendo del tipo de microorganismo y del sustrato a utilizar, la fermentación puede ser en estado sólido (FES) o fermentación sumergida (FS) (Hernández-Melchor et al., 2019).

Es muy probable que los microorganismos relevantes para la agricultura ejerzan un rol importante en varios aspectos encaminados a obtener cultivos sanos y rentables, en los cuales se incluye la gestión integrada de nutrientes y el control de plagas y enfermedades, lo cual permitiría reducir el uso de agroquímicos sin comprometer la producción. Los microorganismos beneficiosos cuentan con un amplio potencial para ofrecer una alternativa prometedora para hacer frente a los impactos nocivos provocados por la agricultura convencional, ampliamente practicada (Gupta et al., 2022). En base a lo anterior se ha planteado obtener un bioproducto a partir de una cepa nativa de *Trichoderma* spp. para su aplicación como agente de control biológico y potenciador del crecimiento de *Capsicum chinense*.

Justificación

Para lograr realizar un cambio en la agricultura convencional y proteger al medio ambiente de los efectos nocivos provocados por los plaguicidas químicos, se deben aplicar nuevas técnicas innovadoras y más amigables con el medio ambiente que permitan realizar un manejo sostenible de los cultivos. Esto se puede lograr con una agricultura más orgánica y menos dependiente de los agroquímicos, realizando un manejo integrado de las plagas (Tyśkiewicz et al., 2022).

El abuso de los agroquímicos sintéticos aplicados en los cultivos para la prevención y control de fitopatógenos ha provocado graves problemas para la salud de las personas y el bienestar del medio ambiente. Es por ello por lo que la aplicación de agentes de control biológico es una importante alternativa para mantener a los cultivos sanos y contrarrestar los efectos causados por la agricultura convencional, la cual ha dejado grandes impactos en el medio ambiente y la salud humana. En los últimos años han salido al mercado varios bioproductos como bioplaguicidas y biofertilizantes, de los cuales destacan los que contienen o son realizados a base de hongos del género *Trichoderma* spp., debido a su capacidad para controlar o destruir patógenos de plantas y estimular el crecimiento de las mismas gracias a su relación simbiótica (Tucci et al., 2010).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para evaluar la capacidad de las bacterias y hongos no patógenos como agentes de control biológico, para poder sacarlos al mercado como una alternativa para la prevención de enfermedades en los cultivos que es más amigable con el medio ambiente. Los principales microorganismos que han mostrado una mayor efectividad para el control de enfermedades son *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Trichoderma* spp., *Glomus mosseae*, *Gliocladium virens*, *Pythium oligandrum* y *Beauveria bassiana* (Tyśkiewicz et al., 2022).

El biocontrol es una técnica innovadora que se basa en el desarrollo sostenible de la agricultura mediante la aplicación de organismos vivos o sus metabolitos en los cultivos para el

control de fitopatógenos y enfermedades. Esta técnica a diferencia de la agricultura convencional no afecta a la salud humana ni al medio ambiente, debido a que no se emplean sustancias químicas tóxicas, por lo cual, permite mantener un equilibrio ecológico. En el biocontrol se realiza la prevención del ataque de los fitopatógenos utilizando organismos vivos que funcionan como depredadores naturales, competidores directos por los nutrientes o como parásitos de las plagas que atacan a los cultivos (Utrilla-Florez, 2021).

En todo el mundo, a diario se producen enormes cantidades de desechos orgánicos provenientes de una agricultura que busca satisfacer la creciente demanda de alimentos, dejando de lado el adecuado manejo de los residuos. Este manejo inadecuado conlleva grandes consecuencias para la sustentabilidad agrícola y salud humana debido a la contaminación que puede llegar a causar (Koul et al., 2022). La degradación descontrolada de los residuos agroindustriales provoca la contaminación de las fuentes hídricas, de la tierra y del aire, provoca graves problemas medioambientales y favorece la proliferación de plagas y enfermedades (Ranganathan et al., 2020). Es por ello que se busca el aprovechamiento de estos residuos mediante el uso de diversos microorganismos para generar bioproductos amigables con el medio ambiente y que reduzcan la cantidad de residuos agroindustriales, evitando así graves afectaciones al medio ambiente y la salud humana.

Los hongos del género *Trichoderma* spp. tienen un gran potencial para ser utilizados en el aprovechamiento de los residuos agroindustriales debido a la capacidad que tienen para crecer rápidamente en una gran variedad de sustratos orgánicos gracias a las distintas enzimas que puede llegar a producir (Tyśkiewicz et al., 2022).

Objetivos

Objetivo General

Obtener un bioproducto a partir de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para su aplicación como agente de control biológico y potenciador del crecimiento de *Capsicum chinense*.

Objetivos específicos

- Aislar la cepa nativa de *Trichoderma* spp.
- Analizar diferentes subproductos como sustratos orgánicos.
- Obtener ácido 3-indol-acético mediante fermentación.
- Evaluar el bioproducto en un cultivo *in vitro* de semillas de *Capsicum chinense*.
- Evaluar como agente de control biológico.

Hipótesis

Hipótesis para Factor A

Ho: El tipo de fermentación no influye en la capacidad del hongo para producir ácido indol acético.

Ha: El tipo de fermentación influye en la capacidad del hongo para producir el ácido indol acético

Hipótesis para Factor B

Ho: El tipo de sustrato utilizado no influye en la capacidad del hongo para producir ácido indol acético.

Ha: El tipo de sustrato utilizado influye en la capacidad del hongo para producir ácido indol acético.

Hipótesis para Factor C

Ho: Los días no influyen en la capacidad del hongo para producir ácido indol acético.

Ha: Los días influyen en la capacidad del hongo para producir ácido indol acético.

Capítulo II

Revisión bibliográfica

***Trichoderma* spp.**

El género de hongos *Trichoderma* spp. data de hace unos 100 millones de años, y a partir de 1970 empezó a ser ampliamente estudiado debido a sus características y potenciales aplicaciones. Desde entonces se ha descubierto que este género abarca más de 10 mil especies, y actualmente han llamado mucho la atención debido a sus aplicaciones en la agricultura para el control biológico de plagas y enfermedades, y la capacidad de promover el crecimiento de las plantas (Bai et al., 2023). Estos hongos se caracterizan por ser filamentosos y principalmente asexuales. *Trichoderma* spp. está ampliamente extendido por todo el mundo y se encuentran fácilmente en la madera en estado de descomposición y en otras presentaciones de materia orgánica de origen vegetal. Suele predominar en el microbioma de praderas, bosques, algunas tierras de cultivo, e incluso en marismas y desiertos, en las distintas regiones climáticas, incluyendo tanto zonas muy cálidas como extremadamente frías (Tyśkiewicz et al., 2022).

Taxonomía *Trichoderma* spp.

El género de hongos *Trichoderma* spp. engloba la fase imperfecta de *Hypocrea*, correspondiente al Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Clase Ascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae. Este fue creado por Persoon en 1794 para los hongos con características específicas como: rápido crecimiento, micelio compacto y disperso, tamaño y forma de conidios, en algunos casos con clamidosporas, y la coloración que va de amarillo a verde (Silva et al., 2019).

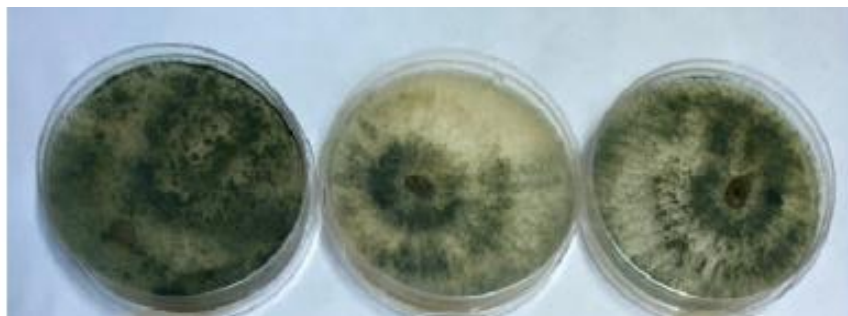
Aspecto macroscópico

Visualmente a nivel macroscópico, los hongos del género *Trichoderma* spp. se diferencian de otros hongos debido a sus peculiares características como la forma de sus colonias que al inicio del crecimiento poseen una superficie plana, pero conforme pasan los

días, aumenta la cantidad de esporas, mismas que se acumulan y forman una estructura levemente algodonosa. Otra de las principales características es la coloración del micelio, que inicia de color blanco y conforme pasan los días se va tornando a blanco verdoso debido a la formación de fialosporas y finalmente se torna de un color verde más intenso. Otra característica de este hongo es su rápido crecimiento cuando se encuentra a temperaturas de van de los 20°C a 25°C (Cruz-Martínez, 2007)

Figura 1

Colonias de hongos del género Trichoderma spp.



Recuperado de: (Andrzejak y Janowska, 2022).

Aspecto microscópico

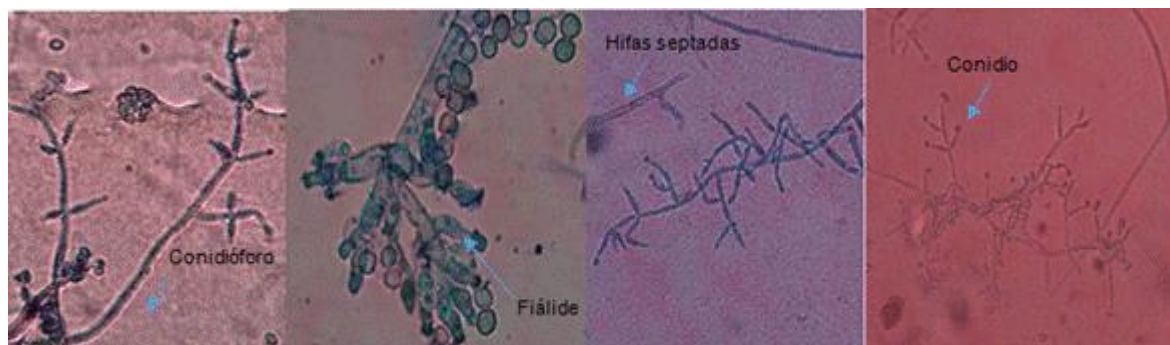
A nivel microscópico se pueden observar varias estructuras que son características del hongo *Trichoderma* spp., como conidios con forma oval que se encuentran al final de pequeños racimos. En su estructura también se pueden observar conidióforos hialinos ramificados, con coloración blanquecina, no verticilados, y fiálides que pueden ser simples o que se encuentran agrupadas. Son haploides y poseen una pared celular de quitina y glucano y son hongos anaerobios facultativos (Pinta-García, 2020).

En la mayor parte de los hongos del género *Trichoderma* spp. se pueden encontrar clamidosporas, las cuales son estructuras de supervivencia del hongo, que le permiten sobrevivir a condiciones adversas y desfavorables, haciendo que sea muy competitivo con otros microorganismos y que pueda perdurar ante el paso del tiempo (Infante et al., 2009). Sin embargo, las clamidosporas más nuevas generadas por el hongo poseen más del 75% de

capacidad germinar, en buenas condiciones de humedad y temperatura. *Trichoderma* spp. pueden producir estructuras como hifas, clamidosporas y conidios (Infante et al., 2009).

Figura 2

Aspectos microscópicos de las cepas del género Trichoderma spp.



Recuperado de: (Infante et al., 2009)

Condiciones de crecimiento

Para un óptimo desarrollo, *Trichoderma* spp. depende de varios factores físicos y nutricionales como:

Temperatura

La temperatura influye sobre el crecimiento del hongo y puede llegar a estimular la formación y la germinación de los conidios. *Trichoderma* spp. puede llegar a crecer a temperaturas que van desde los 10° a 40°C, no obstante, la temperatura óptima para su crecimiento se encuentra entre los 25 a 30°C. Cuando la temperatura es extrema el hongo puede dejar de crecer, sin embargo, quedan sus conidióforos, los cuales germinan cuando las condiciones mejoran, permitiendo que el hongo perdure. En cambio, cuando la temperatura es baja, el metabolismo del hongo disminuye, haciendo que su crecimiento sea muy lento, y esto se suele utilizar como método para conservar al hongo sin que se deteriore (Poalacin, 2015)

Humedad:

La humedad es uno de los factores que influyen significativamente en la

actividad metabólica del hongo, ya que, si el medio presenta un bajo porcentaje de humedad se ve limitada la propagación de los nutrientes y degradación del sustrato, lo que a consecuencia trae un bajo crecimiento microbiano. Por otro lado, un alto porcentaje de humedad puede traer como consecuencia la disminución de la porosidad del sustrato, lo cual va a dificultar la transferencia de oxígeno. Por ello, es importante el control de humedad presente en el medio, para lograr favorecer la producción de metabolitos. Para el caso de fermentaciones sólidas con hongos el porcentaje de humedad óptimo varía entre el 20 y 70% (Poalacin, 2015).

Aireación:

El oxígeno y el dióxido de carbono son esenciales para el crecimiento del hongo, no obstante, elevadas concentraciones de CO₂ provenientes de la respiración celular se pueden acumular en sistemas cerrados y esto provoca la inhibición del crecimiento del microorganismo (Poalacin, 2015).

pH:

El pH es otro factor importante a tomar en cuenta para el crecimiento de *Trichoderma* spp., ya que, a pesar de que puede crecer en sustratos que se encuentran en un rango de pH de 2 a 9, tiene un mejor crecimiento y desarrollo en un rango de pH de entre 5.5 a 6.5 (Infante et al., 2009). Pero, cuando el pH del sustrato sobrepasa los 9.0, el proceso de germinación se ve seriamente afectado (Poalacin, 2015).

Tamaño de partícula del sustrato:

Otro factor a tener en cuenta para un adecuado crecimiento del hongo es el tamaño de las partículas del sustrato, debido a que, las partículas pequeñas permiten una adecuada aireación, permitiendo que el hongo pueda degradar el sustrato y por ende, tener un óptimo crecimiento, por el contrario, cuando el tamaño de las partículas es extremadamente pequeño, la aireación del sustrato se dificulta, debido al espacio interarticular reducido, disminuyendo la respiración, y entorpeciendo el crecimiento del

microorganismo (Poalacin, 2015).

Exposición de luz:

La gran parte de especies de *Trichoderma* al ser fotosensibles, pueden ser sometidas a periodos de luz para obtener una mayor esporulación, mientras que para favorecer el proceso de colonización del hongo en diferentes sustratos, el hongo puede ser expuesto a periodos alternados de luz y oscuridad (Poalacin, 2015).

Esporulación:

Los hongos de este género tienen la capacidad de crecer rápidamente en amplia variedad de sustratos tanto naturales como artificiales. Dentro del laboratorio, los hongos cultivados en agar pueden ser expuestos a luz durante varios segundos para estimular la producción de conidios. Se ha demostrado que la cantidad total de conidios producidos en el medio es inversamente proporcional a la concentración de carbono. A concentraciones menores de 50 g/L, se tiene una alta producción de conidios y a concentraciones superiores de carbono, la producción de conidios disminuye. Por ello, la concentración de carbono es un factor extremadamente importante a considerar cuando se busca obtener una alta producción de conidios. Asimismo, las altas concentraciones de sales minerales (70 g/L) disminuyen significativamente la esporulación (Cruz-Martínez, 2007).

Germinación:

El proceso de germinación depende de la fuente del carbono, es decir, depende del tipo de enlace que puede ser disacárido o polisacárido, ya que dependiendo del tipo de enlace, el hongo secreta enzimas que hidrolizan los azúcares para iniciar el proceso de germinación en los medios de cultivo (Cruz-Martínez, 2007).

Salinidad:

El crecimiento del hongo puede ser inhibido por altas concentraciones de cloruro de sodio (80 g/L) y aunque el hongo tolera concentraciones de 60 g/L, se ha reportado

que esto puede ocasionar mutaciones que perjudican el proceso de conidiogénesis ya que la producción de esporas se va disminuyendo de forma significativa (Cruz-Martínez, 2007).

Necesidades nutricionales:

Los hongos del género *Trichoderma* spp. se pueden desarrollar fácilmente en una amplia variedad de hábitats debido a que las especies de este género secretan enzimas hidrolíticas que pueden degradar sustratos complejos como el almidón, pectina, celulosa, entre otros y utilizarlos como fuente de carbono, además, tienen la capacidad de usar ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono. De igual manera, puede usar amplia variedad de compuestos nitrogenados como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. De igual manera, requiere de micronutrientes, sales, vitaminas y elementos traza en pequeñas cantidades para tener un óptimo crecimiento y desarrollo (Cruz-Martínez, 2007).

Aplicaciones de *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. actualmente es utilizado por la industria alimenticia para la producción de alimento de mascotas, aves y ganado, debido a que segrega enzimas como glucanasas, quitinasas, proteasas, y xilanasas. En algunos de los casos se utiliza la enzima β -glucanasa para mejorar el proceso de elaboración de cerveza y también es utilizada en la producción de zumo de frutas. En la industria textil las enzimas celulasas son utilizadas para ayudar en el proceso de suavizar y acondicionar los textiles, además, de la producción de polvos de lavado. Ciertas especies de este género también son usadas para la biorremediación de lugares contaminados por hidrocarburos del petróleo, explosivos, plaguicidas, metales pesados y cianuro (Sood et al., 2020).

Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

La capacidad de biocontrol que tienen ciertas especies de *Trichoderma* se debe a los diferentes mecanismos de acción que se han descrito hasta la actualidad, los cuales ayudan a

regular el desarrollo de fitopatógenos. Dentro de los mecanismos se encuentran la competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis, que son mecanismos de acción directa frente al hongo fitopatógeno (Tyśkiewicz et al., 2022).

Competencia

La competencia es un mecanismo muy importante usado por los microorganismos y consiste en un comportamiento dispar entre microorganismos que tienen un requerimiento de nutrientes similar, provocando que uno de los microorganismos ocupe una mayor cantidad de espacio y nutrientes, disminuyendo así la disponibilidad para el resto de los microorganismos. Este antagonismo es potenciado por las propiedades del microorganismo como la plasticidad ecológica y crecimiento, y factores como el pH, temperatura, humedad, entre otros (Infante et al., 2009).

La plasticidad ecológica y capacidad de competencia de los hongos del género *Trichoderma* spp. se ve evidenciada al encontrarlo fácilmente en diferentes tipos de suelos. Por lo general, este hongo está bien adaptado para colonizar rápidamente diferentes sustratos y para sobrevivir a condiciones desfavorables mediante la formación de clamidosporas. *Trichoderma* spp. también es considerado un hongo saprófito gracias a su rápido crecimiento, elevada especulación, y a la gran cantidad de enzimas que posee y le permiten adaptarse con facilidad a diferentes tipos de sustratos. La competencia se da principalmente por nitrógeno, carbohidratos y microelementos (Infante et al., 2009).

Micoparasitismo

El micoparasitismo ocurre cuando un hongo antagónico parasita a otro hongo, el cual es utilizado como huésped. El género *Trichoderma* spp. es considerado un micoparásito necrotrófico. Actualmente se conocen más de 75 especies con esta capacidad, las cuales detectan y se adhieren a los hongos fitopatógenos que usarán como huéspedes para realizar una acometida física por medio de intensas

ramificaciones y enrollamientos. También realizan penetraciones en el hongo huésped o ataques químicos, degradando la pared celular del fitopatógeno gracias a las enzimas hidrolíticas y sustancias antifúngicas que puede secretar *Trichoderma* spp. hasta provocar la muerte del huésped (Tyśkiewicz et al., 2022).

Antibiosis

En este tipo de mecanismo, se presenta una acción directa de los antibióticos y metabolitos tóxicos que son producidos por el hongo que actúa sobre otro hongo que es sensible a estos. Muchas especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios que pueden ser volátiles o no volátiles, de los cuales, solo cierto tipo de metabolitos tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos con los que no hacen contacto físico (Infante et al., 2009).

Biocontrol con *Trichoderma* spp.

Los agentes de biocontrol implementados en la agricultura se dividen en dos grupos en base a los métodos de acción usados para inhibir o eliminar a los fitopatógenos. El primer grupo, en el cual se encuentra el género *Trichoderma* spp. se conoce como “generalistas” debido a su capacidad de controlar una gran variedad de microorganismos patógenos, gracias a sus diferentes mecanismos de acción, y el segundo grupo se conoce como “especialistas” debido a que están limitados a un número más reducido de patógenos específicos. Estos biocontroladores realizan parasitismo directo o micoparasitismo, mediante la exudación de compuestos químicos, penetración física, antibiosis, o por la colonización de los diferentes nichos ecológicos y competencia por nutrientes (Woo et al., 2014).

La capacidad de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico de plagas y enfermedades de plantas fue descubierto en 1930 por Weindling, en donde observó que *T. lignorum* protegía a los cítricos del fitopatógeno *Rhizoctonia solani* por medio del micoparasitismo. *Trichoderma* spp. también realiza el biocontrol mediante la competencia con los fitopatógenos por nutrientes, espacio y mediante la secreción de antifúngicos y enzimas

líticas (Tyśkiewicz et al., 2022).

La popularidad del hongo *Trichoderma* spp. como agente de biocontrol ocurre gracias a que tiene la capacidad de crecer y desarrollarse rápidamente en diversos sustratos y a que puede seguir creciendo en presencia de muchos de los productos químicos, incluyendo algunos fungicidas, por lo que resulta ideal para ser usado en la agricultura para el control de enfermedades, aplicándolo incluso en combinación con fertilizantes, insecticidas, herbicidas y otros agroquímicos. Este hongo puede adaptarse a las alteraciones de las condiciones climáticas llegando a producir una enorme cantidad de conidios y clamidosporas (Tyśkiewicz et al., 2022).

Interacción *Trichoderma* -Planta

Trichoderma spp. es muy conocido por su capacidad para establecer relaciones con las plantas que resultan beneficiosas para ambos organismos. Esta interacción es posible gracias a señalizaciones químicas, en donde el hongo segrega sustancias químicas que cambian el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma de las plantas. Esto le otorga a la planta múltiples beneficios como un mayor crecimiento y tolerancia a estreses tanto bióticos como abióticos. Algunos estudios han descubierto que en la interacción de *Trichoderma* spp. con las plantas intervienen proteínas, pequeños fragmentos de ARN, varios metabolitos secundarios, y compuestos orgánicos volátiles. Esta interacción entre *Trichoderma*-planta se da con la colonización de la raíz de las plantas hospedadoras, aumentando el crecimiento de la planta, así como la tolerancia al estrés, y haciendo que sea más resistente al ataque de los fitopatógenos (Silva et al., 2019).

Fermentación

Las fermentaciones son procesos en los que se utilizan microorganismos procariontes y eucariontes para el procesamiento y transformación de sustratos, en productos de alto valor agregado (Hernández-Melchor et al., 2019). Para que una fermentación sea posible, primero se establece un medio y las condiciones adecuadas para el crecimiento y metabolismo del

microorganismo, tales como: el pH, temperatura, niveles de oxígeno, nutrientes, entre otras (Cruz-Martínez, 2007).

Las bacterias y los hongos utilizados por las diferentes industrias se cultivan a gran escala mediante procesos de fermentación para obtener los productos de interés provenientes del metabolismo celular de estos microorganismos. La fermentación en estado sólido y la fermentación sumergida, son las más usadas a nivel industrial para la producción de enzimas y compuestos bioactivos. Es por ello que ambos tipos de fermentación han sido utilizados para la producción de *Trichoderma* spp. y de sus compuestos bioactivos (Hernández-Melchor et al., 2019).

Fermentación sumergida

La fermentación sumergida también es conocida como fermentación líquida, este tipo de fermentación es uno de los más usados en biotecnología, ya que cuando se aplica este tipo de procesos para la multiplicación de microorganismos se obtiene un producto homogéneo, además de que en este tipo de fermentación es más controlable factores como temperatura, pH, aireación y se puede medir la biomasa de manera directa (Poalacin, 2015).

Fermentación sólida

La fermentación en estado sólido (FES), es un tipo de fermentación que se caracteriza por la utilización de microorganismos en sustratos con bajos porcentajes de agua. Al ser un método sencillo y de baja complejidad, la FES es muy rentable para la producción de hongos y sus metabolitos (Zhang et al., 2022). A gran escala, la FES presenta varios beneficios en la producción de hongos, esporas y compuestos bioactivos gracias a la alta productividad de la fermentación, bajos requerimientos energéticos, económicos y de agua, es sencilla de operar y brinda la posibilidad de usar residuos o subproductos de otras industrias como fuente de carbono (Cui et al., 2021).

Actualmente se tiene mucho interés por la FES, debido a que aprovecha

residuos agroindustriales para obtener compuestos bioactivos de alto interés industrial y por ende, reduciendo la alta contaminación que estos podrían generar, si son desechados directamente al ambiente (Baldoni et al., 2020).

Contaminación por residuos agroindustriales

La diversa vegetación presente en Ecuador se utiliza para diferentes fines, pero esencialmente es destinada a la alimentación, sin embargo, cuando no se hace un buen manejo de los residuos agroindustriales, estos pueden llegar a ser perjudiciales para el agua, suelo y aire (Corrales y Chacha-Coyago, 2021).

Sustratos

Residuos sólidos orgánicos

Alrededor del mundo se puede encontrar una amplia variedad de sustratos orgánicos que pueden ser aplicados en la multiplicación de especies de *Trichoderma*. Por lo general se usan granos de arroz precocidos, pero este tipo de sustrato presenta un alto valor económico en comparación a otros sustratos. Los residuos agrícolas que presentan elevado contenido de celulosa son una buena alternativa para la multiplicación del hongo. Hasta la actualidad, varios investigadores han utilizado residuos de cosecha como sustratos para el desarrollo de *Trichoderma*, entre los cuales se encuentran cascarillas de arroz, cáscaras de maní, bagazo de caña de azúcar, cáscaras de tomate, cáscaras y testa de las semillas de cacao, rastrojo de soja y maíz, entre otros (Pinta-García, 2020).

Residuos de cosecha

En los últimos años ha empezado un gran interés en aprovechar residuos de las cosechas de diversos cultivos, ya que en algunas partes del mundo estos residuos son quemados para preparar el terreno para un próximo cultivo, sin embargo, esta práctica puede generar problemas ambientales y con ello el empobrecimiento de la materia orgánica del suelo, a partir de esta situación surge el querer aprovechar los residuos orgánicos, y es por ello que se motiva y concientiza el tratamiento de estos residuos, ya que estos pueden usarse como

sustratos para ciertos microorganismos benéficos (Pinta-García, 2020).

***Trichoderma* en la producción de AIA**

La mayoría de las especies del género *Trichoderma* son productoras de fitohormonas como las auxinas, gran parte de las especies producen AIA (ácido indol acético) en presencia de un aminoácido precursor (L-triptófano), no obstante, se ha descrito que sólo ciertas especies pueden sintetizar AIA en vías independientes de aminoácidos, asimismo para la producción de esta fitohormona de manera in vitro se debe tener en cuenta factores importantes como la temperatura y pH (Tyśkiewicz et al., 2022).

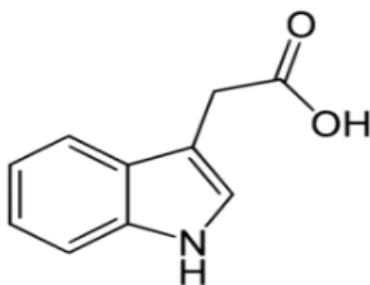
Ácido indol-3-acético (AIA)

El ácido indol acético puede ser sintetizado tanto por plantas como ciertos microorganismos, es por ello que la auxina que comúnmente se puede encontrar es AIA, el cual tiene un papel importante en el desarrollo fisiológico de las plantas como alargamiento de brotes, iniciación de raíces, dominancia apical, tropismos e inducción de la división celular (Ghoreishi et al., 2023).

La fórmula química del ácido indol acético es $C_{10}H_9NO_2$, y su peso molecular es de 175 g/mol, en su estructura el grupo carboxilo está unido a la posición C-3 del anillo indol mediante un grupo metileno, y la distancia entre la carga negativa del grupo carboxilo con la carga residual positiva del anillo aromático (actividad auxínica) es de 0,5 nm (Vico, 2017).

Figura 3

Estructura química del ácido indol acético



Recuperado de: (Vico, 2017).

Métodos para determinar AIA

Para la determinación de fitohormonas en medios de fermentación se pueden utilizar varias técnicas, sin embargo, no todas presentan una alta especificidad de la concentración. Entre los métodos más utilizados se encuentra la técnica de espectrofotometría utilizando el reactivo de Salkowski, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de alta afinidad (HPLC), siendo la última la técnica más sensible y precisa para cuantificar metabolitos producidos (Vico, 2017).

Determinación colorimétrica de Salkowski

La técnica que utiliza el reactivo de Salkowski se fundamenta en que las sales férricas oxidan los compuestos indólicos, cuando ocurre esto y se obtiene un resultado positivo, se logra observar una coloración que puede ir desde un color rosa claro a un rosa intenso, la coloración va a depender de la concentración de compuestos indólicos presentes en el medio. Se ha descrito que para que ocurra una mayor absorbancia de la solución que contiene compuestos índoles, la longitud de onda debe ser a 530 nm (Vico, 2017).

Familia *Capsicum* spp.

El género *Capsicum* spp., tiene su origen en Sudamérica, en una amplia área que se encuentra entre Perú, Colombia y Ecuador, en la región Andina, al oeste-noroeste de Sudamérica, donde fueron domesticadas y posteriormente diversificadas. Pasado el siglo XV, los frutos de *Capsicum* spp. empezaron a ser comercializados y cultivados en diferentes partes del mundo, lo cual provocó la aparición de una mayor diversificación, dando como resultado miles de razas locales adaptadas a una amplia variedad de condiciones climáticas, sin embargo, algunas de las variedades que se cultivan en Ecuador, contienen los rasgos y características más valiosas (Silvar y García-González, 2017).

Los frutos de *Capsicum* spp., contienen vitaminas A y C, carotenoides, fenoles, terpenoides, esteroides y alcaloides, los cuales son compuestos bioactivos de gran importancia

por su acción contra las enfermedades degenerativas. Este género cuenta con más de 200 frutos distintos ampliamente cultivados por todo el mundo, los cuales varían en color, textura, tamaño, forma, sabor y aroma, sin embargo, las más representativas y ampliamente cultivadas son *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens* (Sosa et al., 2017).

Especies cultivadas en Ecuador

En Ecuador, se puede encontrar 10 especies de la familia *Capsicum* spp., y más de 60 variedades. Sin embargo, solo 5 son explotadas en la agricultura con fines comerciales, las cuales son: *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens* y *C. frutescens* (Larenas et al., 2015).

Enfermedades

Es muy común ver los frutos del género *Capsicum* spp. comercializados en los mercados en presentaciones frescas en los mercados de hortalizas, no obstante, su producción es complicada debido a la susceptibilidad que tienen los cultivos de este género al ataque de fitopatógenos, los cuales afectan los cultivos, provocando grandes pérdidas. Normalmente en el cultivo de *Capsicum* spp. se suele aplicar de forma periódica una amplia variedad de pesticidas químicos, lo cual genera residuos tóxicos para las plantas, pone en riesgo la salud de los agricultores y consumidores, y provoca contaminación al medio ambiente. Además, el uso indiscriminado de los fungicidas provoca como consecuencia que muchos de los hongos fitopatógenos expresen resistencia a estos compuestos (Azevedo et al., 2020).

Capsicum chinense

El chile habanero es una planta que puede llegar a crecer hasta 2,5 metros de altura y sus frutos son de color verde, pero pueden cambiar conforme aumentan su madurez. Es así que se comercializan en tres colores, chiles de color verde, el naranja (debido a su semimadurez) y el rojo (completamente maduro). Este chile tiene su origen en una zona que se extiende desde Brasil hasta el norte de Argentina. *Capsicum chinense* es muy conocido por su acritud característica que provoca un picor severo, y clasificado como uno de los chiles más

picantes del mundo (Park et al., 2016). Gracias a sus propiedades únicas, *Capsicum chinense* es ampliamente usado en la gastronomía, la industria alimentaria, en la medicina para la elaboración de fármacos y en la industria química para la fabricación de bases para pinturas y gases lacrimógenos (González et al., 2020).

Cultivo *in vitro*

A partir de los inicios del siglo XX, el cultivo *in vitro* ha ganado gran interés en la investigación de plantas a nivel básico y aplicado, ya que mediante esta técnica se pueden producir plantas que estén libres de enfermedades, se puede tener una rápida multiplicación de genotipos, transformación del genoma de plantas y para la producción de metabolitos de alto valor comercial. En los cultivos *in vitro* se aplican medios de cultivo nutritivos y las condiciones de crecimiento son controladas según los requerimientos de los órganos vegetales (Espinosa et al., 2018).

Hongos fitopatógenos

Existe una amplia variedad de hongos que son fitopatógenos, los cuales tienen un impacto negativo en cultivos agrícolas, ya que estos son causantes de una pérdida anual de aproximadamente 15% en todo el mundo. Es por ello por lo que se debe entender cómo funciona la interacción entre el fitopatógeno y la planta huésped, para así planear los mecanismos de defensa para lograr reducir las pérdidas agrícolas. Dentro de las moléculas que secreta el fitopatógeno (efectores) se encuentran productos proteicos, ARN pequeños y micotoxinas, las cuales modulan la actividad metabólica de la planta y con ello la respuesta inmunitaria (Blackman y Subramaniam, 2023).

***Fusarium* spp.**

Los hongos que pertenecen al género *Fusarium* son conocidos por su capacidad para parasitar plantas y actuar como fitopatógenos, de igual manera, pueden actuar como patógenos en animales (Torbaty et al., 2021). Este es un género de hongos filamentosos que atacan a muchas plantas de interés agronómico (Ma et al., 2013).

Al igual que en muchos otros cultivos, en cultivos de *Capsicum chinense* especies del género *Fusarium* provocan la pudrición de las raíces, y por ende la marchitez de las plantas. Este hongo es el principal agente causal de la pudrición del cultivo de chile habanero, se ha reportado que incluso puede afectar hojas, tallos y cotiledones (Reyes et al., 2012).

Agroquímicos convencionales

Los agroquímicos convencionales consisten en una amplia variedad de químicos sintéticos que se utilizan para el control de plagas como bacterias, hongos, insectos y nemátodos, responsables de grandes pérdidas en la producción agrícola. Según su estructura química, los pesticidas se pueden clasificar en distintos grupos: los organofosforados, los hidrocarburos clorados, los carbamatos y los derivados de la carbamida (Kanakari y Dendrinou-Samara, 2023).

Desventajas de los agroquímicos convencionales

La sobredosificación y el abuso de los pesticidas ha provocado graves consecuencias como la resistencia de los fitopatógenos, daños causados al medio ambiente y afectaciones en la salud de las personas y animales, debido a la alta toxicidad de los pesticidas, y a que son fácilmente absorbidos por medio la piel, mediante inhalación o ingestión. Debido a la alta toxicidad, muchos de estos productos químicos se han prohibido y retirado del mercado, y el proceso para el desarrollo de nuevos productos es lento debido a que se requiere de mucha investigación, grandes inversiones, permisos, y es un proceso bastante lento. Esto ha provocado que las opciones de productos químicos para el control de plagas disponibles en el mercado sean cada vez menos. Por ejemplo, actualmente todos los plaguicidas que contengan glifosato están prohibidos por la Agencia de Protección Ambiental debido a los graves efectos negativos que provoca en la salud humana y medio ambiente (Kanakari y Dendrinou-Samara, 2023).

Muchos pesticidas utilizados en la agricultura terminan contaminando los sistemas de alimentos y las fuentes de agua, y al ingresar a nuestro cuerpo por exposición directa o mediante la ingesta de agua y alimentos contaminados, causan daños en organismo, como cardiotoxicidad y hepatotoxicidad (El-Nahhal y El-Nahhal, 2021). Algunos estudios han demostrado que fungicidas de uso común que contienen triazol provocan severos daños en hígado (Stoelting et al., 2020). También se ha evidenciado que los fungicidas usados para el control de enfermedades en los cultivos afectan a la microbiota del suelo, lo cual reduce la capacidad de producción y tiene consecuencias sobre la salud de las plantas (Shi et al., 2019). Muchos pesticidas usados en los cultivos terminan llegando a ríos y arroyos, poniendo en riesgo la biota acuática, debido a la alta toxicidad (Mac Loughlin et al., 2022).

Debido a esto, actualmente se requieren de nuevas técnicas para el control de plagas en los cultivos, que no sean nocivas para la salud y que no tengan impactos negativos en el medio ambiente. Por ello, actualmente se están realizando investigaciones para el desarrollo de nuevas técnicas utilizando la nanotecnología (Kanakari y Dendrinou-Samara, 2023). Otras investigaciones han optado por desarrollar técnicas de biocontrol de plagas mediante el uso de microorganismos benéficos. Por ejemplo, para evitar la proliferación de infecciones por hongos en los frutos después de las cosechas normalmente se suelen aplicar plaguicidas sintéticos, no obstante, estos productos químicos ponen en riesgo la salud de las personas y animales, y al medio ambiente, además de inducir resistencia en los hongos (Hernandez et al., 2021). Actualmente, la biotecnología implementada en la agricultura ha brindado herramientas y métodos sostenibles para la prevención y el control de plagas y enfermedades, tanto en plantas como en los frutos postcosecha (Sare et al., 2021).

Bioproducto

En los últimos años la biotecnología se ha desarrollado y ha tomado gran relevancia en

varias industrias, puesto que ha permitido crear nuevos productos, mejorar procesos y resolver problemas en diferentes áreas. Gracias a su rápido crecimiento, la biotecnología ha logrado crear bioproductos de alto valor que se han utilizado para combatir epidemias, curar enfermedades, crear combustibles más amigables con el ambiente y mejorar la agricultura (Ma G. , 2020).

La capacidad de muchos microorganismos para la obtención de bioproductos ha sido analizada y estudiada con detalle durante varios años y actualmente se muchos de estos microorganismos se utilizan en varias industrias para la elaboración de diversos bioproductos (Gęsicka et al., 2021).

Los microorganismos han sido empleados por el ser humano desde hace cientos de años en procesos biotecnológicos para la obtención de bioproductos mediante procesos como la fermentación, además de aplicaciones en la agricultura y transformación de residuos. Actualmente, mediante herramientas de la biología sintética se busca mejorar procesos actuales o crear nuevos bioproductos como medicamentos, combustibles menos contaminantes, biomateriales, entre otros, a partir de fuentes de carbono asequibles. Por ello, es necesario seguir estudiando a los microorganismos y comprender su funcionamiento y aprovecharlos en la creación de bioproductos (McCarty y Ledesma-Amaro, 2019).

Los bioinsumos agrícolas obtenidos a partir de *Trichoderma* spp. se comercializan como agentes de control biológico que permiten proteger a las plantas de una gran variedad de patógenos, y como biofertilizantes o mejoradores del desarrollo de las plantas, en donde *Trichoderma* spp. actúa estableciéndose en la raíz de las plantas en donde obtiene alimento y a cambio, otorga un mejor crecimiento y tolerancia al estrés (Alfiky y Weisskopf, 2021).

Capítulo III

Metodología

Ubicación del área de investigación

Ubicación política

País: Ecuador

Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas

Cantón: Santo Domingo

Parroquia: Luz de América

Dirección: Santo Domingo, Vía Quevedo km 24, margen izquierdo

Ubicación ecológica

Zona de vida: Bosque húmedo tropical

Altitud: 224 msnm

Temperatura media: 24.6 °C

Precipitación: 2860 mn/año

Humedad relativa: 85%

Heliofanía: 680 horas luz/año

Suelos: Franco Arenoso

Ubicación geográfica

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología, Biotecnología Vegetal, Biología Molecular, Bromatología y Biociencias y Laboratorio de Ciencias Químicas de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, sede Santo Domingo.

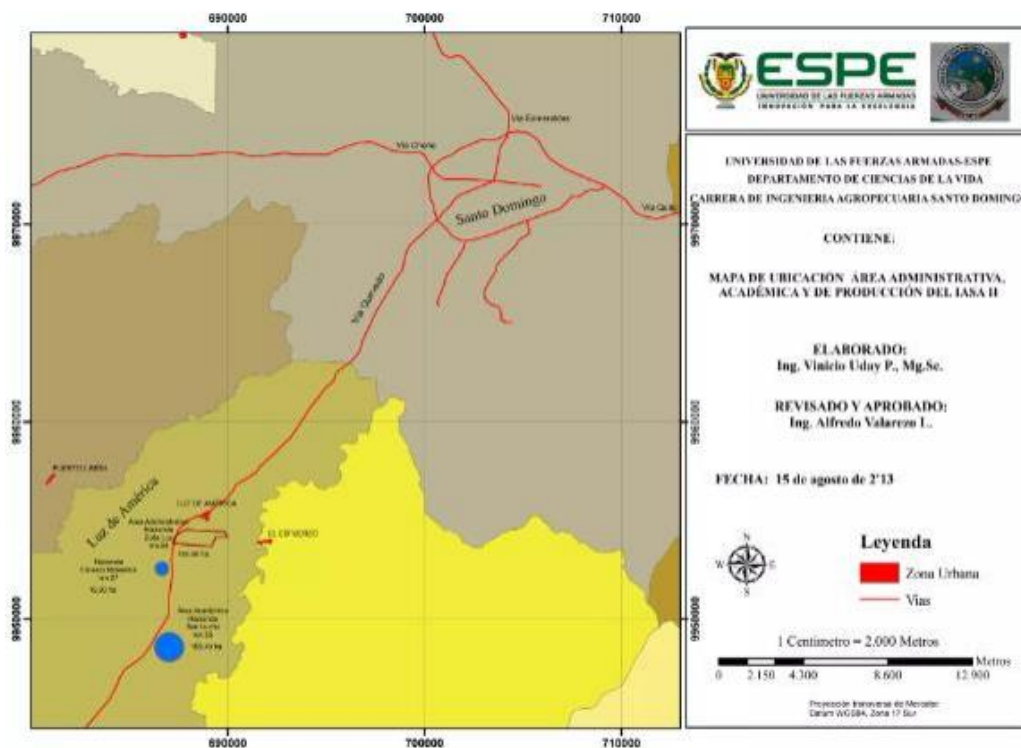
Latitud: 00° 24' 36"

Longitud: 00° 24' 36"

Altitud: 270 msnm

Figura 4

Mapa de ubicación geográfica del área de investigación



Nota: Ubicación geográfica de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE

Materiales

Muestreo del suelo

Tabla 1.

Materiales utilizados en la toma de muestras de suelo

Insumos
Palas
Fundas Ziploc
Cinta métrica

Nota: Tabla de elaboración propia.

Aislamiento y siembra del microorganismo

Tabla 2

Materiales, insumos y reactivos usados para la siembra del microorganismo

Equipos	Insumos	Reactivos
Autoclave	Cajas Petri	Agar Papa Dextrosa (PDA)
Cámara de flujo laminar	Frasco de vidrio	Alcohol
Plancha de calentamiento	Asa de inoculación	
Incubadora	Parafilm	
Balanza analítica	Lámparas de alcohol	
	Agitador magnético	
	Espátula	

Nota: Tabla de elaboración propia.

Purificación del hongo *Trichoderma* spp.

Para la obtención de cepas puras del hongo *Trichoderma* spp., se utilizó la técnica de resiembra sucesiva.

Tabla 3

Equipos, insumos y reactivos utilizados en la purificación de Trichoderma spp.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Autoclave	Espátula	Agar Papa Dextrosa (PDA)	Cepas de <i>Trichoderma</i>
Balanza	Frasco de vidrio con tapa de rosca	Alcohol	
Incubadora	Asa de inoculación		
Cámara de flujo laminar	Parafilm		
Plancha de calentamiento	Lámparas de alcohol Agitador magnético Cajas Petri		

Nota: Tabla de elaboración propia.

Identificación del microorganismo

La identificación del microorganismo se realizó mediante reconocimiento de estructuras macroscópicas (color de micelio, forma de micelio) y para las estructuras microscópicas se realizó dos tinciones (azul de metileno y azul de lactofenol) y se compararon los resultados obtenidos mediante bibliografía.

Tinción de azul de metileno

Tabla 4

Equipos, insumos y reactivos utilizados en la identificación microscópica de Trichoderma spp. mediante tinción de azul de metileno

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
microscopio	Portaobjetos	Azul de metileno	Cepa de <i>Trichoderma</i>
Cámara de flujo laminar	Cubreobjetos		
	Cinta adhesiva		
	Varillas de agitación		
	Aceite de inmersión		

Nota: Tabla de elaboración propia.

Tinción de azul de lactofenol

Tabla 5

Equipos, insumos y reactivos utilizados en la identificación microscópica de Trichoderma spp. mediante tinción de azul de lactofenol.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Microscopio	Portaobjetos	Azul de lactofenol	Cepa de <i>Trichoderma</i>
Cámara de flujo laminar	Cubreobjetos		
	Cinta adhesiva		
	Varillas de agitación		
	Aceite de inmersión		

Nota: Tabla de elaboración propia.

Fermentación en sustratos orgánicos

Para la fermentación con el microorganismo se preparó un medio mínimo enriquecido (MME) el cual se suplemento con sustratos orgánicos (cáscaras de cacao y bagazo de caña de azúcar).

Preparación de Medio Mínimo Enriquecido (MME)

Tabla 6

Equipos, insumos y reactivos utilizados para la elaboración del medio mínimo enriquecido (MME)

Equipos	Insumos	Reactivos
Plancha de agitación	Vaso de precipitación	Na ₂ HPO ₄
Balanza analítica	Espátula	KH ₂ PO ₄
	Papel aluminio	NaCl
	Agitador magnético	(NH ₄) ₂ SO ₄
		NaNO ₃
		NaSO ₄
		MgSO ₄ ·7H ₂ O
		CaCl ₂ ·2H ₂ O
		FeCl ₃ ·6H ₂ O
		MnCl ₂ ·4H ₂ O
		ZnCl ₂
CuCl ₂ ·2H ₂ O		
CoCl ₂ ·2H ₂ O		
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O

Nota: Tabla de elaboración propia.

Obtención de los sustratos orgánicos

Tabla 7

Equipos, insumos y reactivos utilizados para la obtención de sustratos orgánicos.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Estufa	Papel Aluminio	Antibiótico	Cáscaras de cacao
Molino	Cuchillos		Bagazo de caña de azúcar
	Fundas ziploc		

Nota: Tabla de elaboración propia.

Preparación de medios

Tabla 8

Equipos, insumos, reactivos y muestras para la preparación de los medios.

Equipos	Insumos	Reactivos
Balanza	Matraces Erlenmeyer 250 mL	Cáscaras de cacao
Autoclave	Espátula	Bagazo de caña de azúcar
	Papel aluminio	Medio Mínimo Enriquecido (MME)
	Gasas	L-Triptófano
	Algodón	

Nota: Tabla de elaboración propia.

Preparación del buffer para la inoculación de *Trichoderma* en los medios de cultivo.

Tabla 9

Equipos, insumos y reactivos para la preparación del buffer para la inoculación de Trichoderma en los medios de cultivo.

Equipos	Insumos	Reactivos
Autoclave	Vaso de precipitación	Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 0.1 M
Plancha de agitación	Agitador magnético	Agua destilada

Nota: Tabla de elaboración propia.

Inoculación del hongo *Trichoderma spp.* en los medios de cultivo

Tabla 10

Equipos, insumos y reactivos para la inoculación de Trichoderma en los medios de cultivo.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Vasos de precipitación	Buffer de siembra	Cepas de <i>Trichoderma</i>
Plancha de agitación	Agitador magnético	Etanol al 70%	
Autoclave	Asa triangular		
	Pipetas volumétricas		

Nota: Tabla de elaboración propia.

Incubación de los medios de cultivo

Tabla 11

Equipos utilizados en la incubación de los medios de cultivo

Equipos
Incubadora
Agitador orbital

Nota: Tabla de elaboración propia.

Toma de muestras de los medios de cultivo en fermentación

Tabla 12

Equipos, insumos y muestras para la toma de muestras de los medios de cultivo en fermentación.

Equipos	Insumos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Vasos de precipitación	Medios de fermentación
Autoclave	Tubos de ensayo	
	Micropipetas	
	Puntas de micropipetas	
	Lámparas de alcohol	

Nota: Tabla de elaboración propia.

Evaluación de la biomasa producida

Tabla 13

Equipos, insumos y muestras para la evaluación de biomasa producida.

Equipos	Insumos	Muestras
Espectrofotómetro	Vasos de precipitación	Medios de fermentación
Centrífuga	Tubos de ensayo	
	Micropipetas	
	Puntas de micropipetas	

Nota: Tabla de elaboración propia.

Preparación del reactivo de Biuret y cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas en cada tratamiento se realizó mediante el método de Biuret, además, se utilizó BSA (Albúmina de suero bovino) como estándar.

Tabla 14

Equipos, insumos, reactivos y muestras para la cuantificación de proteínas mediante Biuret.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Espectrofotómetro	Vasos de precipitación	Sulfato de cobre (II) pentahidratado	Medios de fermentación
Centrífuga	Tubos de ensayo	Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado	

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Plancha de agitación	Micropipetas	Hidróxido de sodio 10%	
	Probetas	Solución de BSA (Albúmina de suero bovino)	

Nota: Tabla de elaboración propia.

Detección de Ácido indol acético (AIA)

Para la cuantificación de ácido indol acético presente en cada medio de fermentación se usó el reactivo de Salkowski.

Tabla 15

Equipos, insumos, reactivos y muestras para la detección de ácido indol acético.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
Centrífuga	Tubos de ensayo	Salkowski	Medios de fermentación
Espectrofotómetro	Gradillas		
	Pipeta volumétrica		
	Vaso de precipitación		

Nota: Elaboración propia

Obtención del bioproducto

Tabla 16

Equipos, insumos, reactivos y muestras para la obtención del bioproducto

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Centrífuga	Filtro de 0.2 μm	Agua destilada	Medios de fermentación
	Tubos de ensayo	Alcohol	
	Gradillas		
	Micropipeta		
	Pipeta volumétrica		

Nota: Tabla de elaboración propia

Evaluación del bioproducto en un cultivo *in vitro* de *Capsicum chinense*

Tabla 17

Equipos, insumos, reactivos y muestras para la evaluación del bioproducto en el cultivo in vitro de Capsicum chinense.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestras
Autoclave	Frascos de vidrio	Agar nutritivo	Semillas de ají
Balanza	Espátula		Bioproducto
Cámara de flujo laminar	Vasos de precipitación		
Plancha de calentamiento			

Nota: Tabla de elaboración propia.

Evaluación del efecto antagonista de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp.

Tabla 18

Equipos, insumos, reactivos y muestras utilizados para el enfrentamiento de Trichoderma spp. frente a Fusarium spp.

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
Autoclave	Cajas Petri	Agar Papa Dextrosa (PDA)	Cepas de <i>Trichoderma</i> spp.
Cámara de flujo laminar	Frasco de vidrio	Alcohol	Cepas de <i>Fusarium</i> spp.
Plancha de calentamiento	Asa de inoculación		
Incubadora	Parafilm		
Balanza analítica	Lámparas de alcohol Agitador magnético Regla		

Nota. Elaboración propia

Métodos

Muestreo del suelo

Se realizó una toma de muestras en un área boscosa sin intervención agrícola, ubicada en el recinto 30 de Noviembre, situado en la parroquia Luz de América, perteneciente a la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. Con ayuda de una pala limpia se tomó submuestras de suelo, retirando la materia orgánica de la superficie y cavando un hoyo de 40

cm de profundidad a 20 cm desde la base de un árbol, repitiendo este procedimiento hasta una muestra completa conformada por 10 submuestras colocadas en un recipiente de plástico limpio. A continuación, se homogeneizó la muestra de suelo, se separó 1 kg en una funda Ziploc y se rotuló debidamente para su respectivo procesamiento en el laboratorio.

Aislamiento y siembra del microorganismo

Dentro del laboratorio la muestra de suelo se pasó por un tamiz para retirar las partículas más grandes de la muestra.

Para la elaboración del medio de cultivo PDA se procedió a pesar los gramos necesarios y se diluyeron en agua destilada, seguidamente se procedió a homogeneizar en una plancha de calentamiento con un agitador magnético, con el fin de activar el agar, una vez homogeneizado el medio se procedió a autoclavar a 120°C a 15 psi durante 20 minutos. Una vez ya obtenido el medio de cultivo, dentro de una cámara de flujo laminar se procedió a dispensar el medio en cajas Petri estériles y se dejó gelificar.

Para realizar el aislamiento de *Trichoderma* spp. se realizó una dilución seriada, para lo cual se tomó 10 gramos de la muestra de suelo, se colocó en un vaso de precipitación con 90 ml de agua destilada estéril y se diluyó en una plancha con agitador magnético durante 20 minutos, se tomó una alícuota de 1 mL y se diluyó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, se agitó en el vórtex por 15 segundos, se tomó 1 mL y se repitió el proceso hasta obtener una dilución de 1×10^{-5} . Este procedimiento se realizó por triplicado y se sembró 0.5 ml de las diluciones 1×10^{-5} y 1×10^{-4} en cajas Petri con medio de cultivo PDA acidificado con ácido láctico, con la finalidad de favorecer el crecimiento de hongos. Posteriormente se incubó durante 7 días a 28°C o hasta el apareamiento de las colonias de *Trichoderma*.

Purificación del hongo *Trichoderma* spp.

Para la purificación del hongo se utilizó la técnica de resiembra sucesiva. En donde, dentro de la cámara de flujo laminar, se abrieron las cajas Petri que contenían las colonias de *Trichoderma* spp., posteriormente, con la ayuda de un asa de inoculación se hizo un raspado

sobre el micelio de *Trichoderma* spp, y se inoculó en una nueva placa Petri con medio PDA que se había preparado previamente, luego estas se dejaron incubar a 28°C durante 7 días.

Identificación del microorganismo

La identificación del microorganismo se realizó mediante reconocimiento de estructuras macroscópicas (color de micelio, forma de micelio) y para las estructuras microscópicas se realizó dos tinciones (azul de metileno y azul de lactofenol) y se compararon los resultados obtenidos mediante bibliografía.

Tinción de azul de metileno

Se colocó una gota de azul de metileno en el portaobjetos, para colocar la muestra de micelio se cortó unos 3 cm de cinta adhesiva transparente y cuidadosamente se colocó sobre el micelio de la cepa de *Trichoderma* spp., y seguidamente se colocó sobre la gota de azul de metileno en el portaobjetos para luego observar su estructura en el microscopio

Tinción de azul de lactofenol

Se colocó una gota de azul de lactofenol en el portaobjetos, para colocar la muestra de micelio se cortó unos 3 cm de cinta adhesiva transparente y cuidadosamente se colocó sobre el micelio de la cepa de *Trichoderma* spp., y seguidamente se colocó sobre la gota de azul de metileno en el portaobjetos para luego observar su estructura en el microscopio

Fermentación

Preparación Medio Mínimo Enriquecido (MME)

Para la fermentación con el microorganismo se preparó un medio mínimo enriquecido (MME) el cual está compuesto por: 8,2 g/L Na₂HPO₄, 3,8 g/L KH₂PO₄, 0,4 g/L NaCl, 2,0 g/L (NH₄)₂SO₄, 5,0 g/L NaNO₃, 4,6 g/L NaSO₄, 0,012 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,55 g/L CaCl₂·2H₂O, 1,67 g/L FeCl₃·6H₂O, 0,10 g/L MnCl₂·4H₂O, 0,17 g/L ZnCl₂, 0,043 g/L CuCl₂·2H₂O, 0,06 g/L CoCl₂·2H₂O, 0,06 g/L Na₂MoO₄·2H₂O. Estos compuestos se homogeneizaron en una plancha de calentamiento.

Obtención de los sustratos orgánicos

Se consiguió sustratos como las cáscaras de cacao y el bagazo de caña, a los cuales se les hizo un lavado con agua y sulfato de estreptomicina para eliminar cualquier impureza, posteriormente se les realizó un proceso de secado y seguido se hizo la molienda de estos hasta obtener partículas más pequeñas de cada uno, estas partículas fueron tamizadas para obtener una harina de cada sustrato.

Preparación de medios

Para la fermentación en estado sumergido suplementado con sustrato de cáscara de cacao, a los matraces de control solamente se les agregó 150 mL de MME, mientras que, al resto de matraces se les agregó 5 g de sustrato y 150 mL de MME, en el caso de la fermentación en estado sólido, en los matraces de control se les agregó solamente 50 mL de MME, mientras que, a los otros matraces se les agregó 5 g de sustrato y 50 mL de MME. Una vez preparado los medios de cultivo se ajustó el pH entre 5.5 y 6.5 y se procedió a colocar los tapones de algodón a todos los matraces, esto se llevó a autoclavar a una temperatura de 121°C a 15 psi durante 20 minutos, transcurrido el tiempo, los matraces con medio se dejaron enfriar para colocar 0.5 g de L-Tryp. El mismo procedimiento se realizó para las fermentaciones utilizando como sustrato orgánico el bagazo de caña.

Preparación del buffer para la inoculación de *Trichoderma* en los medios de cultivo.

Para la elaboración del buffer de siembra, previamente se autoclavó agua destilada para diluir 1,91 g de cloruro de magnesio (MgCl₂), por consiguiente, en una plancha de agitación se hizo disolver todo el cloruro de magnesio (MgCl₂).

Inoculación del hongo *Trichoderma spp.* en los medios de cultivo

Primeramente, se esterilizó todos los materiales que se ocuparon en la inoculación, al igual que se desinfectó la cámara de flujo laminar. Por consiguiente, se introdujeron las cajas Petri que contenían las cepas de *Trichoderma*, seguido a esto se colocó el buffer de cloruro de magnesio (MgCl₂) 0.1 M en las cajas Petri que contenían la cepa y con la ayuda de un asa

triangular se removió cuidadosamente el microorganismo y se colocó en un vaso de precipitación, finalmente se midieron 10 mL de la suspensión y se colocaron en cada uno de los matraces.

Incubación de los medios de cultivo

Para la incubación, los matraces se colocaron en un agitador orbital, mismo que fue introducido dentro de una incubadora para así mantener una temperatura de 28°C durante 7 días.

Toma de muestras de los medios de cultivo en fermentación

Previamente se esterilizó todos los materiales y se desinfectó la cámara de flujo laminar, por consiguiente, se ingresaron todos los matraces y se tomaron de cada uno de ellos muestras de 5 mL y se depositaron en tubos de ensayo con tapa de rosca. Las muestras fueron tomadas los días 0, 2,5 y 7.

Evaluación de la biomasa

Para la evaluación de la biomasa producida, se centrifugaron 5 mL de cada muestra de los diferentes días (0, 2, 5, 7 y 8), y se midió la absorbancia mediante espectrofotometría a 540 nm.

Preparación del reactivo de Biuret y cuantificación de proteínas

Para la preparación del reactivo de Biuret, en un frasco ámbar se agregaron 0,75 g de sulfato de cobre (II) pentahidratado y se añadió agua destilada, luego de homogeneizar se agregó 3 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y se agitó suavemente hasta disolver los compuestos, a la solución se le agregó 150 mL de NaOH al 10% (p/v), finalmente con agua destilada se aforó hasta llegar a un volumen final de 500 mL.

Para la cuantificación de proteínas de cada uno de los tratamientos, se tomaron 0,5 mL de muestra y se agregó 2,5 mL de reactivo de Biuret, se deja incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se lee la absorbancia a 540 nm.

En la realización de la curva patrón con BSA se usaron concentraciones de 0 a 10 mg/mL por triplicado, finalmente la concentración de proteínas se determina mediante la interpolación sobre la curva patrón.

Tabla 19

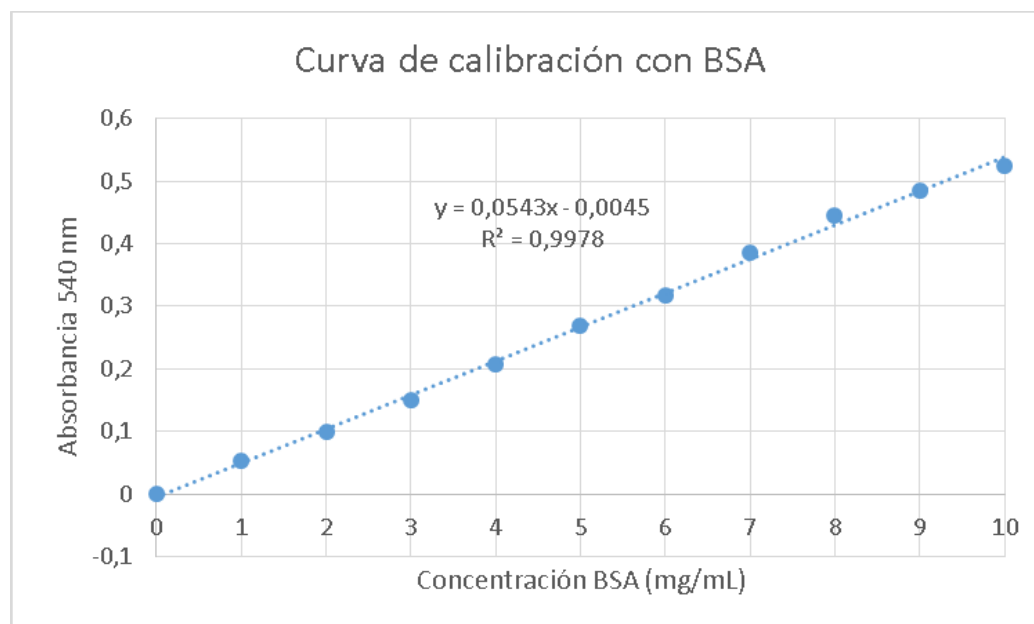
Valores de la curva patrón con BSA

Tubo	Concentración BSA (mg/mL)	Absorbancia (540 nm)
1	0	0
2	1	0,0525
3	2	0,0986
4	3	0,1504
5	4	0,2077
6	5	0,2701
7	6	0,3174
8	7	0,386
9	8	0,4452
10	9	0,4857
11	10	0,5245

Nota: Tabla de elaboración propia.

Figura 5

Curva de calibración de BSA (0 a 10 mg/ml).



La concentración de proteína se calculó mediante la ecuación de la recta:

$$y = 0,0543x - 0,0045$$

Donde:

Y = Absorbancia de las muestras.

Para obtener los datos de concentración de proteínas, se reemplazaron los valores de la absorbancia en la fórmula y se obtuvo el total de proteínas de cada muestra (mg/mL).

Detección de Ácido indol acético (AIA)

Para la detección de ácido indol acético, se centrifugó 5 mL de cada medio de fermentación de los diferentes días que se tomaron las muestras, a partir del sobrenadante se tomó 1 mL de muestra y se agregó 2 mL del reactivo de Salkowski, esto se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se procedió a leer la absorbancia a 530 nm.

La concentración de ácido indol acético se determinó sobre una curva patrón realizada con ácido indol acético comercial a una concentración de 0 a 50 µg/ mL

Tabla 20

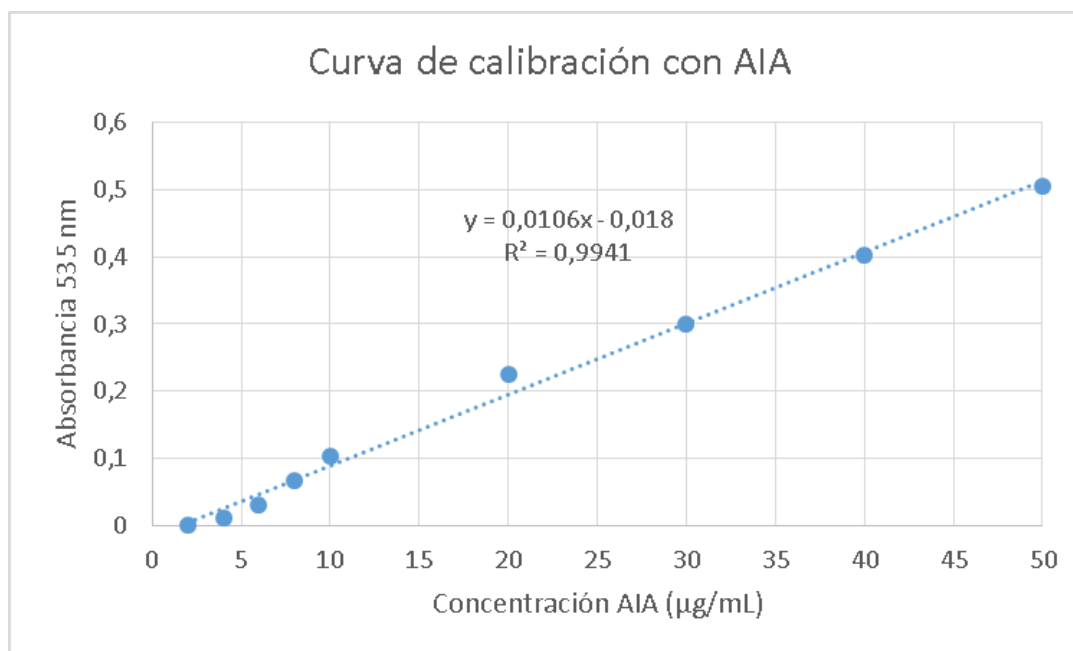
Valores de la curva patrón con Ácido indol acético.

Tubo	Concentración AIA ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	Absorbancia (530 nm)
1	0	0
2	2	0,0105
3	4	0,0312
4	6	0,0671
5	8	0,1032
6	10	0,224
7	20	0,2993
8	30	0,4023
9	40	0,5053
10	50	0,6001

Nota: Tabla de elaboración propia.

Figura 6

Curva de calibración de Ácido indol acético (0 a 50 µg/mg).



La concentración de ácido indol acético se calculó mediante la ecuación de la recta:

$$y = 0,0106 X - 0,018$$

Donde:

Y = Absorbancia de las muestras.

Para obtener los datos de concentración de AIA, se reemplazaron los valores de la absorbancia en la fórmula y se obtuvo el total de AIA de cada muestra (µg /mL).

Obtención del bioproducto

Transcurridos 8 días de la fermentación en estado sólido usando bagazo de caña suplementado con L-triptófano e inoculado con la cepa nativa de *Trichoderma* spp., se da por terminada la fermentación, se retiran los matraces del orbital, se pasa la muestra por un filtro para retirar la parte sólida, se centrifuga a 10000 rpm por 20 minutos y se filtra la parte líquida con un filtro de jeringa con poros de 0.22 m. Se comprueba la presencia del AIA haciendo reaccionar una pequeña muestra con reactivo de Salkowski, se coloca en un recipiente estéril, se etiqueta adecuadamente y se almacena a 4°C.

Evaluación del bioproducto en un cultivo *in vitro* de *Capsicum chinense*

Para la desinfección de las semillas, primero se colocaron en el centro de una gasa estéril, se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 5 minutos con agitación constante, transcurrido el tiempo se hizo enjuagues con agua destilada estéril, seguido a esto se sumergieron las semillas durante 15 minutos en una solución de cloro al 2%, y finalmente a las semillas se les realizó varios enjuagues con agua destilada estéril, y se dejaron secar.

Se realizaron dos ensayos para evaluar el efecto estimulante del bioproducto en la germinación y desarrollo de las plántulas de *Capsicum chinense* en un cultivo *in vitro*. En el primer ensayo se colocaron 10 semillas en una gasa estéril y se sumergieron en el bioproducto durante 24 horas, mientras que, para el segundo ensayo se realizó el remojo de las 10 semillas en agua destilada estéril durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se procedió a sembrar todas las semillas en los tubos con medio de cultivo.

El porcentaje de germinación se evaluó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{A}{B} * 100$$

Donde:

A: semillas germinadas

B: total de semillas

Evaluación del efecto antagonista de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp.

Para la evaluación de la cepa nativa como control biológico, se realizaron cultivos duales de la cepa nativa de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp., para ello, se preparó medio de cultivo PDA y se depositó un disco de 5 mm de diámetro con micelio de *Trichoderma* spp. en un extremo de la caja y en el otro extremo un disco con micelio de *Fusarium* spp. Para el control se sembraron los hongos de manera individual en placas de medio PDA. Todas las interacciones y los testigos se incubaron a 28°C y las mediciones se realizaron cada 24 horas hasta que se observe que el micelio de *Trichoderma* spp. cubra por completo el medio y el

micelio de *Fusarium* spp. en el enfrentamiento.

El ensayo de antagonismo se clasificó en una escala del 1 al 5, siguiendo el método descrito por (Bell et al., 1982), donde:

1. La cepa de *Trichoderma* spp. cubre por completo la superficie del medio, cubriendo totalmente al fitopatógeno.
2. La cepa de *Trichoderma* spp. logra crecer en las dos terceras partes de la superficie del medio.
3. La cepa de *Trichoderma* spp. y el fitopatógeno colonizan cada uno la mitad de la superficie del medio, y ningún organismo domina sobre el otro.
4. El fitopatógeno logra crecer en las dos terceras partes de la superficie del medio y presuntamente resiste la invasión por *Trichoderma* spp.
5. El fitopatógeno crece sobre la cepa de *Trichoderma* spp., y logra cubrir por completo la superficie del medio.

Además, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de las cepas de *Fusarium* frente a la cepa nativa de *Trichoderma* spp., se evaluó mediante la fórmula:

$$PICR = \left(\frac{R1 - R2}{R1} \right) * 100$$

Donde,

R1: Crecimiento radial del hongo fitopatógeno en el control

R2: Crecimiento radial del hongo fitopatógeno en el enfrentamiento con el antagonista

Diseño experimental

Factores y niveles de estudio para la obtención del bioproducto

Tabla 21

Factores de estudio que actúan en el proceso de obtención del bioproducto.

Factores	Simbología	Nivel
Tipo de fermentación (A)	a0	Fermentación sólida
	a1	Fermentación sumergida
Tipo de sustrato (B)	b0	Cáscaras de cacao
	b1	Bagazo de caña
Días de medición	c0	Día 0
	c1	Día 2
	c2	Día 5
	c3	Día 7
	c4	Día 8

Nota: Se especifica el tipo de fermentación, el tipo de sustrato, y los días de medición que fueron aplicados en la obtención del bioproducto.

Tratamientos a comparar para la obtención del bioproducto

Tabla 22

Tratamientos a comparar en la obtención del bioproducto

N°	Tratamiento	Combinación
1	a0b0c0	Fermentación sólida + Cáscaras de cacao + Día 0
2	a0b0c1	Fermentación sólida + Cáscaras de cacao + Día 2
3	a0b0c2	Fermentación sólida + Cáscaras de cacao + Día 5

N°	Tratamiento	Combinación
4	a0b0c3	Fermentación sólida + Cáscaras de cacao + Día 7
5	a0b0c4	Fermentación sólida + Cáscaras de cacao + Día 8
6	a0b1c0	Fermentación sólida + Bagazo de caña + Día 0
7	a0b1c1	Fermentación sólida + Bagazo de caña + Día 2
8	a0b1c2	Fermentación sólida + Bagazo de caña + Día 5
9	a0b1c3	Fermentación sólida + Bagazo de caña + Día 7
10	a0b1c4	Fermentación sólida + Bagazo de caña + Día 8
11	a1b0c0	Fermentación sumergida + Cáscaras de cacao + Día 0
12	a1b0c1	Fermentación sumergida + Cáscaras de cacao + Día 2
13	a1b0c2	Fermentación sumergida + Cáscaras de cacao + Día 5
14	a1b0c3	Fermentación sumergida + Cáscaras de cacao + Día 7
15	a1b0c4	Fermentación sumergida + Cáscaras de cacao + Día 8
16	a1b1c0	Fermentación sumergida + Bagazo de caña + Día 0
17	a1b1c1	Fermentación sumergida + Bagazo de caña + Día 2
18	a1b1c2	Fermentación sumergida + Bagazo de caña + Día 5
19	a1b1c3	Fermentación sumergida + Bagazo de caña + Día 7
20	a1b1c4	Fermentación sumergida + Bagazo de caña + Día 8

Nota: Interacciones formadas en el diseño experimental

Tipo de diseño para la obtención del bioproducto

Para la obtención del bioproducto se aplicó un ANOVA con un arreglo factorial $A \times B \times C$ ($2 \times 2 \times 5$), donde el Factor A corresponde al tipo de fermentación, el Factor B al tipo de sustrato y el Factor C hace referencia a los días de medición, con un total de 20 tratamientos. El diseño experimental fue realizado con 3 repeticiones por tratamiento, dando un total de 60 unidades experimentales.

Capítulo IV

Resultados

Obtención del microorganismo

Figura 7

Toma de muestras de suelo

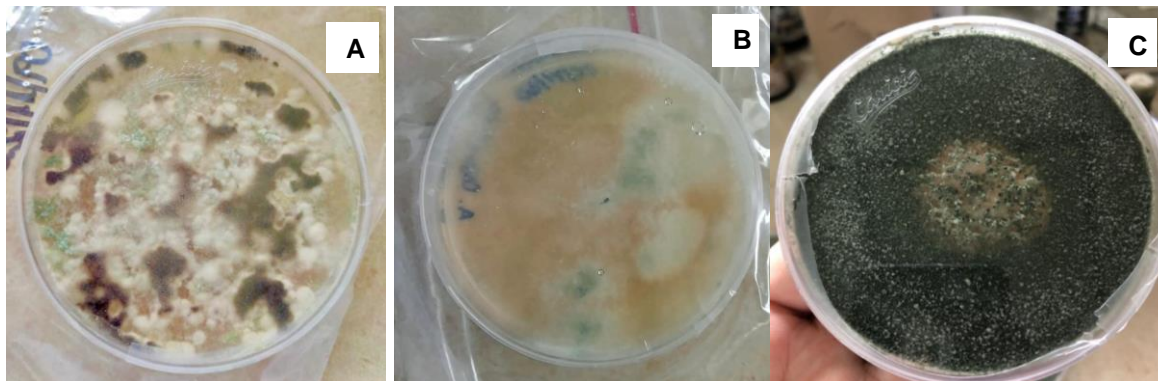


Nota: Lugar de la toma de muestras del suelo en lugar boscoso.

Mediante información bibliográfica se determinó que la muestra de suelo debía ser tomada de un sitio boscoso en el que no haya habido intervención agrícola, y al finalizar el muestreo, se obtuvo 1 kg de muestra homogénea (Figura 7).

Figura 8

Cultivo de la muestra de suelo en PDA



Nota: Hongos aislados a partir de la muestra de suelo.

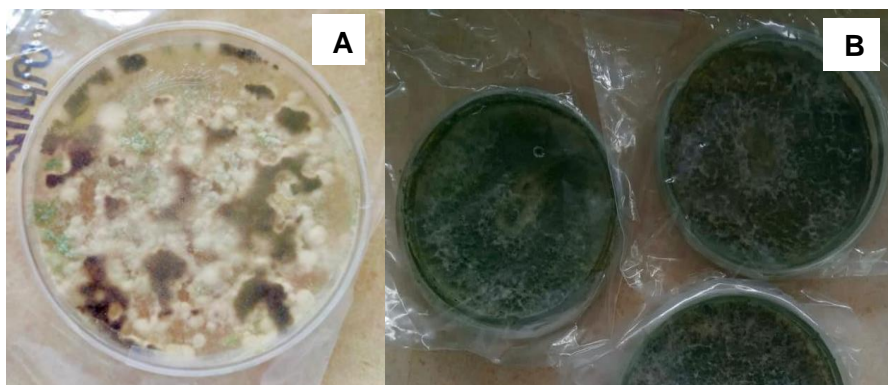
En el cultivo de la muestra de suelo se logró evidenciar el crecimiento de varios hongos (Figura 8 A), entre ellos, se logró identificar la presencia de *Trichoderma* spp. por características macroscópicas como la forma y color del micelio del hongo: *Trichoderma* spp. en los primeros días del cultivo presentó un micelio algodonoso de color blanco (Figura 8 B) el cual se tornó verde claro y posteriormente verde oscuro con el pasar de los días (Figura 8 C), mientras que los demás hongos tenían un color blanco, amarillo y negro.

Purificación de *Trichoderma* spp.

A partir de la siembra de diluciones seriadas de la muestra de suelo en PDA fue posible obtener dentro de los microorganismos aislados, colonias de *Trichoderma* spp., y aplicando la técnica de resiembra se logró obtener al final varias placas con la cepa pura de *Trichoderma* spp. (Figura 9).

Figura 9

Proceso de obtención de la cepa pura de Trichoderma spp.

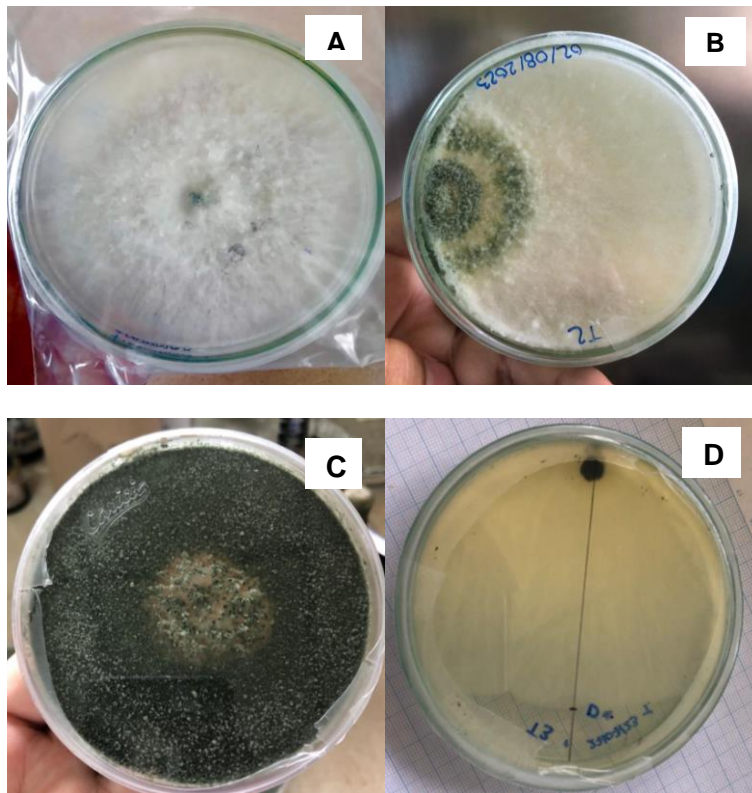


Nota: Proceso de purificación del hongo *Trichoderma* spp.

Identificación macroscópica de *Trichoderma* spp.

Figura 10

Morfología macroscópica y microscópica del hongo del género *Trichoderma* spp.



Nota: Características morfológicas de la cepa nativa de *Trichoderma* spp.

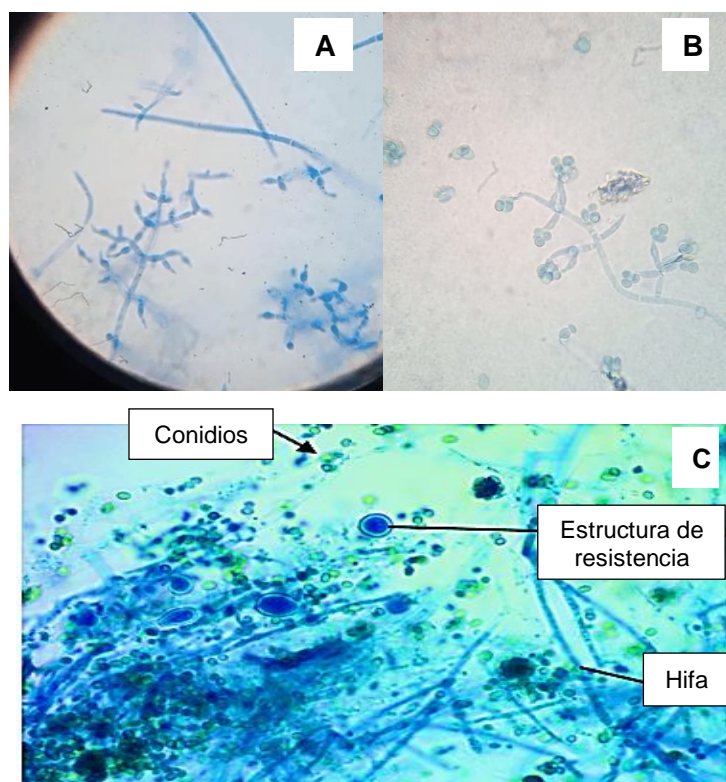
La cepa nativa de *Trichoderma* spp. obtenida de la muestra de suelo presentó un rápido crecimiento. El hongo inició su crecimiento con un micelio plano de color blanco que se extendió rápidamente por la superficie del medio de cultivo y logró cubrirlo por completo en 5 días (Figura 10 A). Al tercer día de su crecimiento se empezaron a formar varias estructuras algodonosas en el micelio del hongo y este empezó a adquirir un mayor volumen. Al sexto día el micelio del hongo empezó a pigmentarse de color verde claro en las zonas en donde inicio su crecimiento (Figura 10 B), al noveno día el micelio empezó a tomar un color verde más oscuro y finalmente, en el día 12 todo el micelio presentó una coloración verde oscura (Figura 10 C). Se observó la formación de anillos concéntricos con un tono verde más oscuro y por

debajo de la placa, al revés del micelio, se observó una coloración amarillo-ambar por debajo de todo el micelio (Figura 10 D).

Identificación microscópica de *Trichoderma* spp.

Figura 11

Morfología macroscópica y microscópica del hongo del género Trichoderma spp.



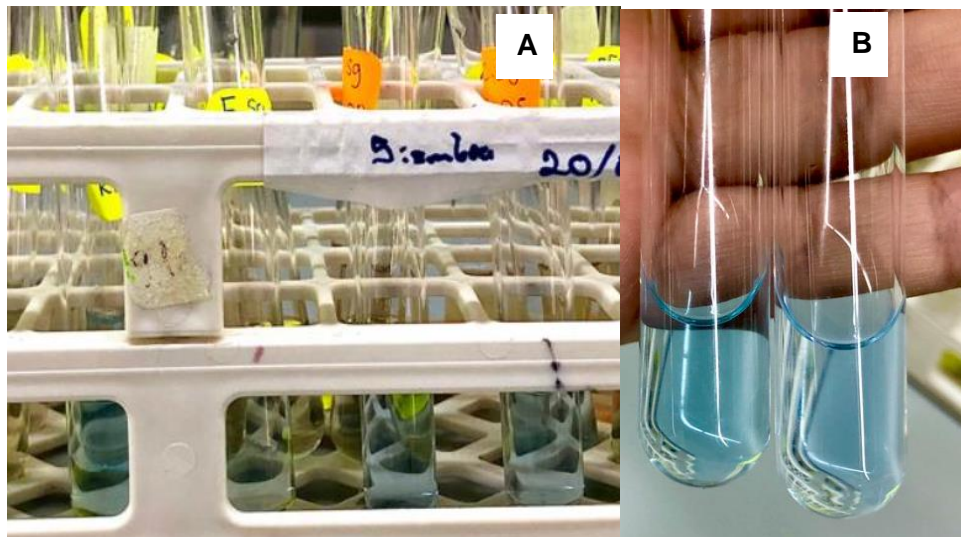
Nota: Características microscópicas de la cepa nativa de *Trichoderma* spp.

Mediante las tinciones con azul de metileno (Figura 11 A) y con azul de lactofenol (Figura 11 B), se logró observar conidióforos hialinos, segmentados y erectos, en los cuales se encontraron fiálides hialinas con estructura similar a una botella, ya que eran anchos del inicio hasta la mitad de la fiálide y delgados en la parte superior, y se encontraban formando agrupaciones. En los ápices de las fiálides se encontraron varias agrupaciones de conidias hialinas, las cuales tenían formas subglobosas y una superficie lisa. También se observó estructuras de resistencia como clamidosporas con formas circulares y oblongas, con una doble pared celular hialina y un núcleo oscuro (Figura 11 C).

Cuantificación de proteínas mediante el método de Biuret

Figura 12

Proteínas totales por método de Biuret



Nota: Cambios de coloración en la reacción del reactivo de Biuret en presencia de proteína.

Aplicando el método de Biuret para la cuantificación de proteínas se observó que, dependiendo del tipo de fermentación, tipo de sustrato y el día de la toma de muestra existe un cambio de coloración distinto, en donde, algunas de las muestras se tornaban de color azul pálido (Figura 12 A) y celeste claro (Figura 12 B). Cabe recalcar que la coloración que toma se debe a la concentración de proteína presente en cada una de las muestras.

Detección de ácido indol acético (AIA) mediante el reactivo de Salkowski

Figura 13

Método colorimétrico para cuantificación de AIA con reactivo de Salkowski



Nota: Cambio de coloración mediante la reacción de Salkowski en presencia de AIA.

Con el método colorimétrico usando el reactivo de Salkowski, de igual manera se logró determinar la presencia de AIA contenido en cada una de las muestras, en donde, dependiendo del tipo de fermentación, el tipo de sustrato y el día de toma de muestra, se observa distintas coloraciones que puede ir desde un color rosa pálido hasta un color rosa fuerte, como se observa en la Figura 13.

Análisis de varianza

Biomasa

Tabla 23

Análisis de varianza para biomasa (Absorbancia)

<i>FV</i>	<i>SM</i>	<i>GI</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:FERMENTACIÓN	5,16478	1	5,16478	94878,87	0,0000
B:SUSTRATO	12,8122	1	12,8122	235364,51	0,0000
C:DIAS	4,10928	4	1,02732	18872,25	0,0000
D:REPLICA	0,000004491	2	0,0000022455	0,04	0,9596
INTERACCIONES					
AB	1,788	1	1,788	32846,18	0,0000
AC	1,28712	4	0,321781	5911,23	0,0000
BC	0,782864	4	0,195716	3595,37	0,0000
ABC	0,683841	4	0,17096	3140,60	0,0000
RESIDUOS	0,00206855	38	0,0000544355		
TOTAL (CORREGIDO)	26,6301	59			

Nota: Considerar el valor $p \leq 0.05$

En los resultados obtenidos del análisis de varianza de la biomasa, considerando un valor de $p \leq 0.05$, se determinó que el tipo de fermentación (Factor A), el tipo de sustrato (Factor B) y los días de medición (Factor C) presentan diferencia significativa, es decir, estos factores influyen al momento de determinar la biomasa producida por *Trichoderma* spp., por otro lado, existe similitud en los datos obtenidos por cada réplica de los tratamientos, es decir, no existe diferencia significativa para el Factor D. Asimismo, teniendo en cuenta las interacciones A*B, A*C, B*C y A*B*C, se determinó que si existe diferencia significativa.

Proteínas

Tabla 24

Análisis de varianza para proteínas totales (mg/mL)

<i>FV</i>	<i>SM</i>	<i>GI</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:FERMENTACIÓN	1,31454	1	1,31454	2,06	0,1590
B:SUSTRATO	9,72456	1	9,72456	15,27	0,0004
C:DIAS	61,3174	4	15,3294	24,06	0,0000
D:REPLICA	2,43625	2	1,21812	1,91	0,1617
INTERACCIONES					
AB	54,5005	1	54,5005	85,56	0,0000
AC	27,1985	4	6,79963	10,67	0,0000
BC	2,1861	4	0,546524	0,86	0,4979
ABC	9,99033	4	2,49758	3,92	0,0092
RESIDUOS	24,2066	38	0,637017		
TOTAL (CORREGIDO)	192,875	59			

Nota: Considerar el valor $p \leq 0.05$

En cuanto a los resultados obtenidos del análisis de varianza para la determinación de proteínas totales, considerando un valor de $p \leq 0.05$, se encontró que el tipo de sustrato (Factor B) y los días de medición (Factor C) presentan diferencia significativa, es decir, los Factores B y C influyen al momento de determinar la cantidad de proteínas totales producidas en el medio de fermentación por *Trichoderma* spp., de la misma manera, considerando las interacciones A*B, A*C, y A*B*C, se determinó que existe diferencia significativa. Mientras que, en el Factor A (Tipo de fermentación) y Factor D (Réplicas), no se encontró diferencia significativa, por lo cual, se determina que los datos obtenidos de cada tratamiento presentan similitud entre sí.

Ácido indol acético**Tabla 25***Análisis de varianza para ácido indol acético AIA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)*

<i>FV</i>	<i>SM</i>	<i>GI</i>	<i>CM</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:FERMENTACIÓN	83832,1	1	83832,1	60519,00	0,0000
B:SUSTRATO	21922,4	1	21922,4	15825,97	0,0000
C:DIAS	50851,8	4	12712,9	9177,57	0,0000
D:REPLICA	7,60019	2	3,8001	2,74	0,0771
INTERACCIONES					
AB	17649,6	1	17649,6	12741,37	0,0000
AC	27446,8	4	6861,71	4953,52	0,0000
BC	5617,46	4	1404,36	1013,82	0,0000
ABC	4436,68	4	1109,17	800,72	0,0000
RESIDUOS	52,6383	38	1,38522		
TOTAL (CORREGIDO)	211817,	59			

Nota: Considerar el valor $p \leq 0.05$

En cuanto a los resultados obtenidos del análisis de varianza para la determinación de la concentración de ácido indol acético (AIA), considerando un valor de $p \leq 0.05$, se determinó que el tipo de fermentación (Factor A), el tipo de sustrato (Factor B) y los días de medición (Factor C) presentan diferencia significativa al igual que las interacciones de cada factor (A*B, A*C, B*C y A*B*C), es decir, que estos factores influyen en la determinación de la concentración de AIA en cada tratamiento. En cuanto al Factor D (Répica) no se encontró diferencia significativa, por lo cual, se determina que los datos obtenidos de las réplicas de cada tratamiento presentan similitud entre sí.

Prueba de significancia de Tukey para Factor A (Tipo de fermentación)

Tabla 26

Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Tipo de fermentación (Factor A)

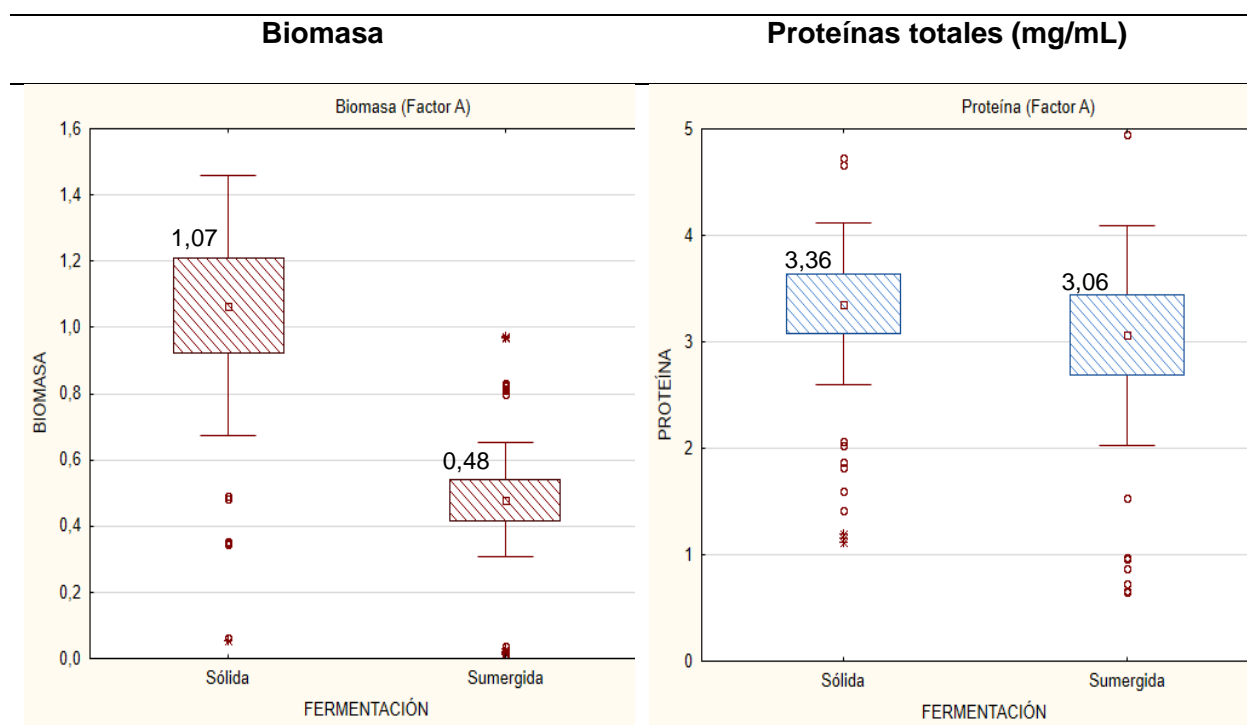
Tipo de fermentación	Biomasa	Proteínas totales	Ácido indol acético
Fermentación Sumergida	0,48 ^A	3,06 ^A	21,13 ^A
Fermentación Sólida	1,07 ^B	3,36 ^A	95,89 ^B

Nota: Considerar valor de $p \leq 0.05$

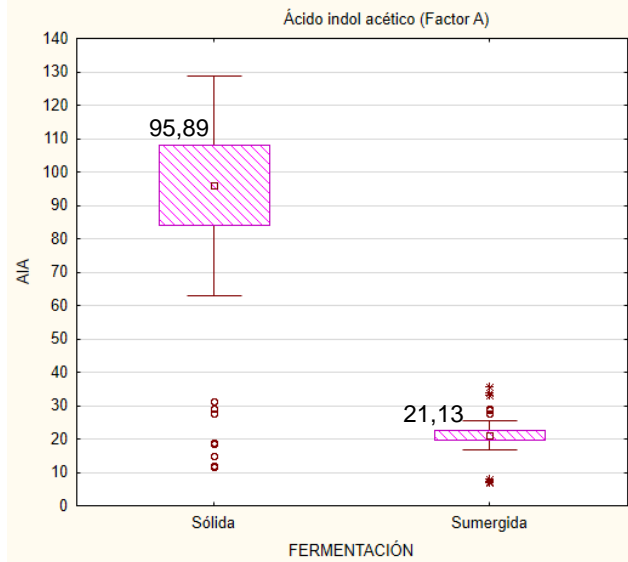
En la Tabla 26, los resultados de la prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0.05$), muestran las medias obtenidas para biomasa, proteínas totales y ácido indol acético que se obtuvieron en el transcurso de la fermentación aplicando fermentación sólida y sumergida (Factor A). Y en la figura 14 se muestran las gráficas de las medias obtenidas en cada variable (biomasa, proteínas, AIA) al aplicar el Factor A (Tipo de fermentación).

Figura 14

Efecto del Factor A (Tipo de fermentación) sobre las variables



Ácido indol acético ($\mu\text{g}/\text{mg}$)



Nota: Efecto del tipo de fermentación sobre las variables de biomasa, proteína y AIA.

En cuanto a la biomasa producida por el hongo en las diferentes fermentaciones se encontró 2 grupos independientes, los cuales indican diferencia significativa, donde el grupo A correspondiente a la fermentación sumergida mostró un valor de 0,48, mientras que el grupo B perteneciente a la fermentación sólida mostró un valor de 1,07, siendo el último el mejor en cuanto al Factor A (Tipo de fermentación).

En los resultados obtenidos para proteínas totales, se encontró que estadísticamente no hay diferencia entre la aplicación de los dos tipos de fermentación (Factor A), ya que en la fermentación sumergida se obtuvo un valor de media de 3,06 mg/mL de proteínas totales, mientras que la fermentación sólida arrojó un valor total de 3,36 mg/mL.

Con respecto a la obtención de AIA, se encontró dos grupos independientes (Grupo A y B), los cuales muestran diferencia significativa. El valor de la media más alto se encontró en el Grupo B, que corresponde a la fermentación sólida con un total de 95,89 $\mu\text{g}/\text{mg}$, mientras que en el Grupo A (Fermentación sumergida) se obtuvo un total de 21,13 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Prueba de significancia de Tukey para Factor B (Tipo de sustrato)

En la Tabla 27, los resultados de la prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0.05$), muestran las medias obtenidas para biomasa, proteínas totales y ácido indol acético que se obtuvieron en el transcurso de la fermentación aplicando el Factor B (Tipo de sustratos). Y en la figura 15 se muestran las gráficas de las medias obtenidas en cada variable (biomasa, proteínas, AIA) al aplicar el Factor B.

Tabla 27

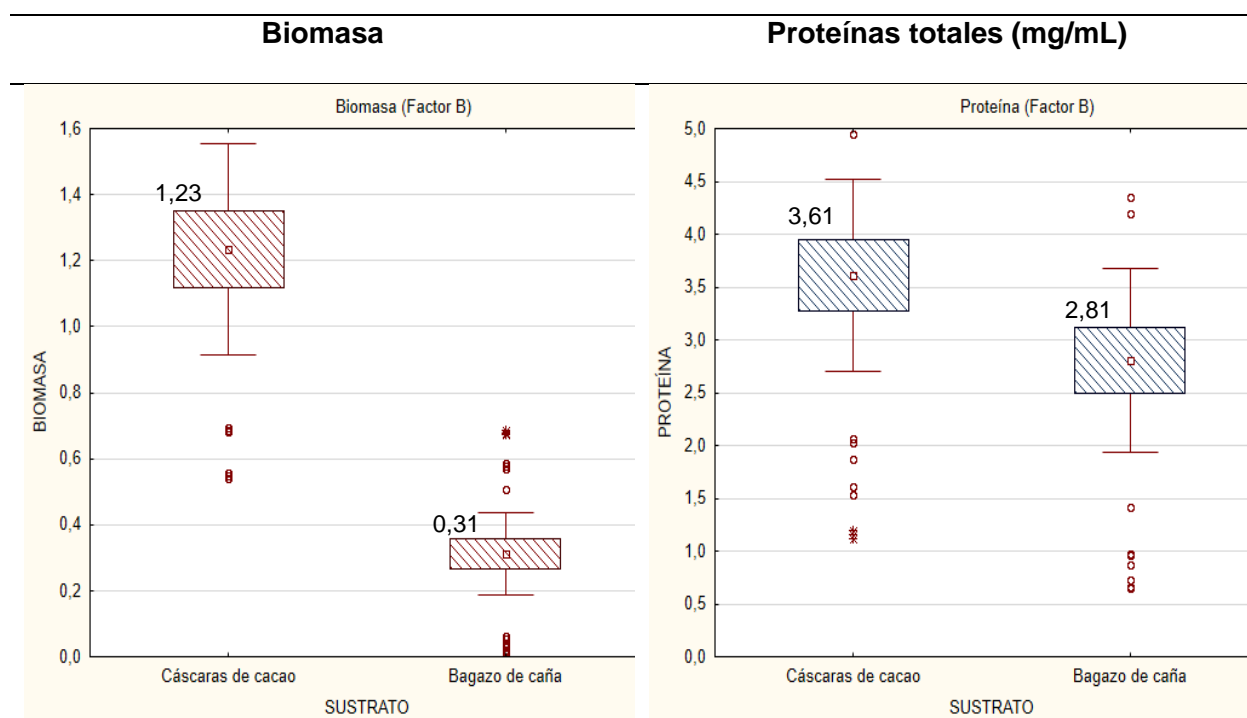
Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Tipo de sustrato (Factor B)

Tipo de sustrato	Biomasa	Proteínas totales	Ácido indol acético
Cáscaras de cacao	1,23 ^B	3,61 ^B	39,39 ^A
Bagazo de caña	0,31 ^A	2,81 ^A	77,62 ^B

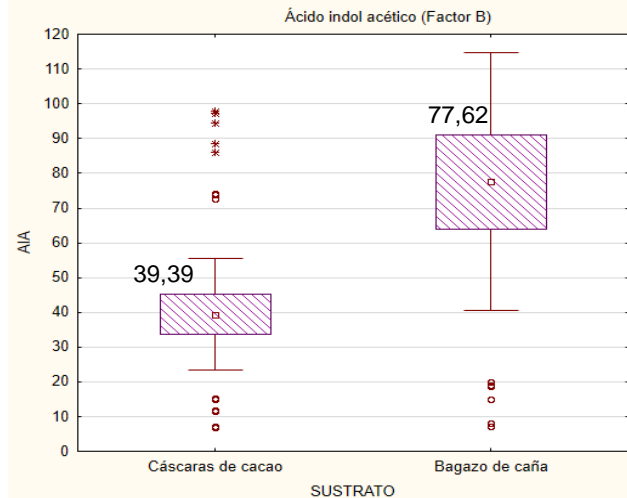
Nota: Considerar valor de $p \leq 0.05$

Figura 15

Efecto del Factor B (Tipo de sustrato) sobre las variables



Ácido indol acético ($\mu\text{g}/\text{mg}$)



Nota: Efecto del tipo de sustrato sobre las variables de biomasa, proteína y AIA.

Con respecto a los valores obtenidos sobre el efecto del tipo de sustrato en la biomasa producida, se encontró dos grupos independientes que señalan que existe diferencia significativa, en donde, se determina que el mejor sustrato para la producción de biomasa es aplicando cáscaras de cacao (Grupo B) ya que se obtuvo una media de 1,23, mientras que, al aplicar bagazo de caña como sustrato se obtuvo un valor de 0,31.

Los resultados obtenidos para proteínas totales muestran diferencia significativa, ya que se encontró dos grupos independientes (Grupo A y B). En donde, el grupo A correspondiente a la aplicación de bagazo de caña mostró valores desfavorables para proteína con un valor de 2,81 mg/mL, mientras que el grupo B correspondiente a las cáscaras de cacao presentó un valor de media de 3,61 mg/mL, en base a los datos, se determinó que el sustrato ideal para la obtención de proteína es la aplicación de cascaras de cacao.

En cuanto a la obtención de ácido indol acético, se encontró dos grupos independientes (Grupo A y B), los cuales muestran diferencia significativa. El valor de la media más alto se encontró en el Grupo B, que corresponde al bagazo de caña como sustrato, mismo que tuvo como resultado un valor de media de 77,62 $\mu\text{g}/\text{mg}$, mientras que en el Grupo A (Cáscaras de cacao) se obtuvo un total de 39,39 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Prueba de significancia de Tukey para Factor C (Día de medición)

En la Tabla 28, los resultados de la prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0.05$), muestran las medias obtenidas para biomasa, proteínas totales y ácido indol acético que se obtuvieron durante los días de medición (Factor C). Y en la figura 16 se muestran las gráficas de las medias obtenidas en cada variable (biomasa, proteínas, AIA) al aplicar el Factor C.

Tabla 28

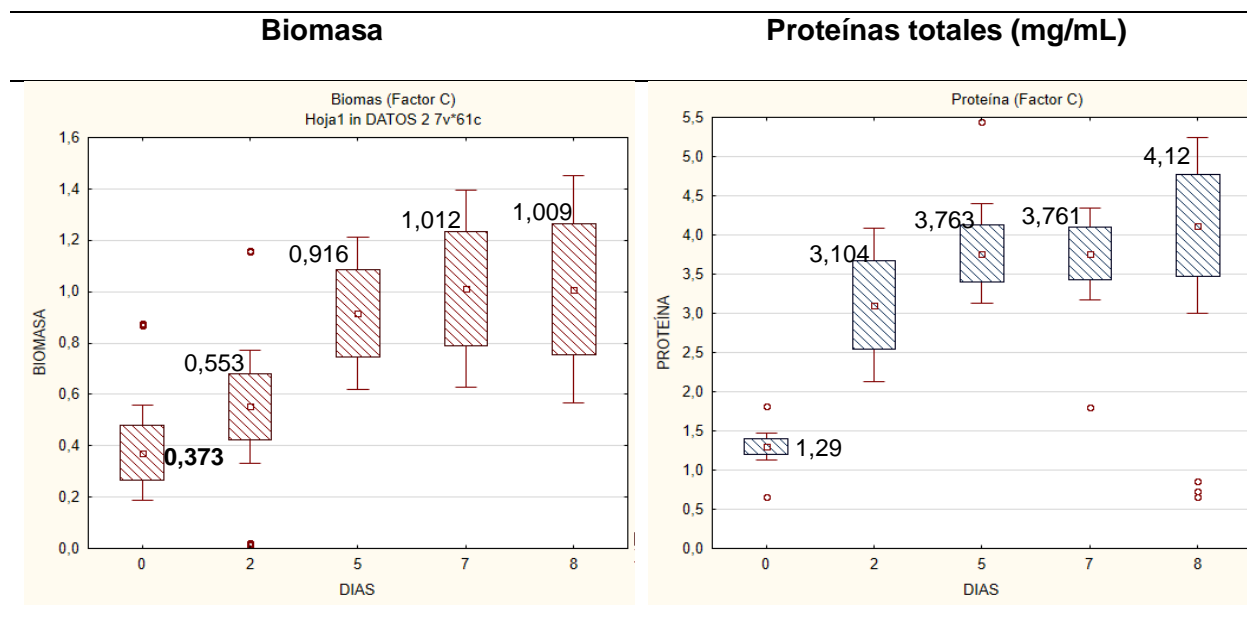
Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Día de medición (Factor C)

Día de medición	Biomasa	Proteínas totales	Ácido indol acético
0	0,373 ^A	1,2970 ^A	10,96 ^A
2	0,553 ^B	3,104 ^B	40,56 ^B
5	0,916 ^C	3,763 ^{BC}	68,47 ^C
7	1,012 ^D	3,761 ^{BC}	83,52 ^D
8	1,009 ^D	4,121 ^C	89,01 ^E

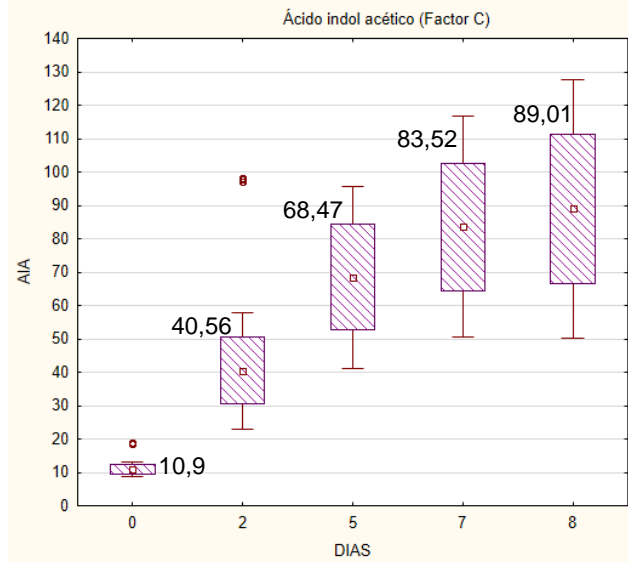
Nota: Considerar valor de $p \leq 0.05$

Figura 16

Efecto del Factor C (Días de medición) sobre las variables



Ácido indol acético ($\mu\text{g}/\text{mg}$)



Nota: Efecto del tiempo sobre las variables de biomasa, proteína y AIA.

En cuanto a la biomasa producida por el hongo en los diferentes días, se encontró que el Día 0 tuvo un valor de media de 0,373, en el Día 2 se mostró un valor de 0,553, seguido del Día 5 en el que se obtuvo una media de 0,916. En los días 7 y 8 no se muestra diferencia significativa, ya que en el Día 7 se obtuvo un valor de 1,012, mientras que en el Día 8 se obtuvo un total de 1,009.

Comparando los datos obtenidos con respecto a la concentración de proteína en los diferentes días, se encontró que el día 8 presenta los valores más altos con un total de 4,121 mg/mL. Comparando el día 7 y 5 no se muestra diferencia significativa ya que se encontró valores de 3,761 mg/mL y 3,763 mg/mL respectivamente. En el día 2 se obtuvo una media de 3,104 mg/mL y finalmente en el día 0 se tuvo un total de mg/mL.

Con respecto a la obtención de ácido indol acético, se encontró cinco grupos independientes (Grupo A, B, C, D y E), los cuales muestran diferencia significativa entre sí. El valor de la media más alto se encontró en el día 8 con un total de 89,01 $\mu\text{g}/\text{mg}$, seguido del día 7 con un valor de 83,52 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y del día 5 con un total de 68,47 $\mu\text{g}/\text{mg}$, mientras que los días 0 y 2 mostraron valores más bajos, 10,96 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y 40,56 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente.

Prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0.05$) para Interacción A*B*C (Tipo de fermentación*Tipo de sustrato*Días de medición)

Tabla 29

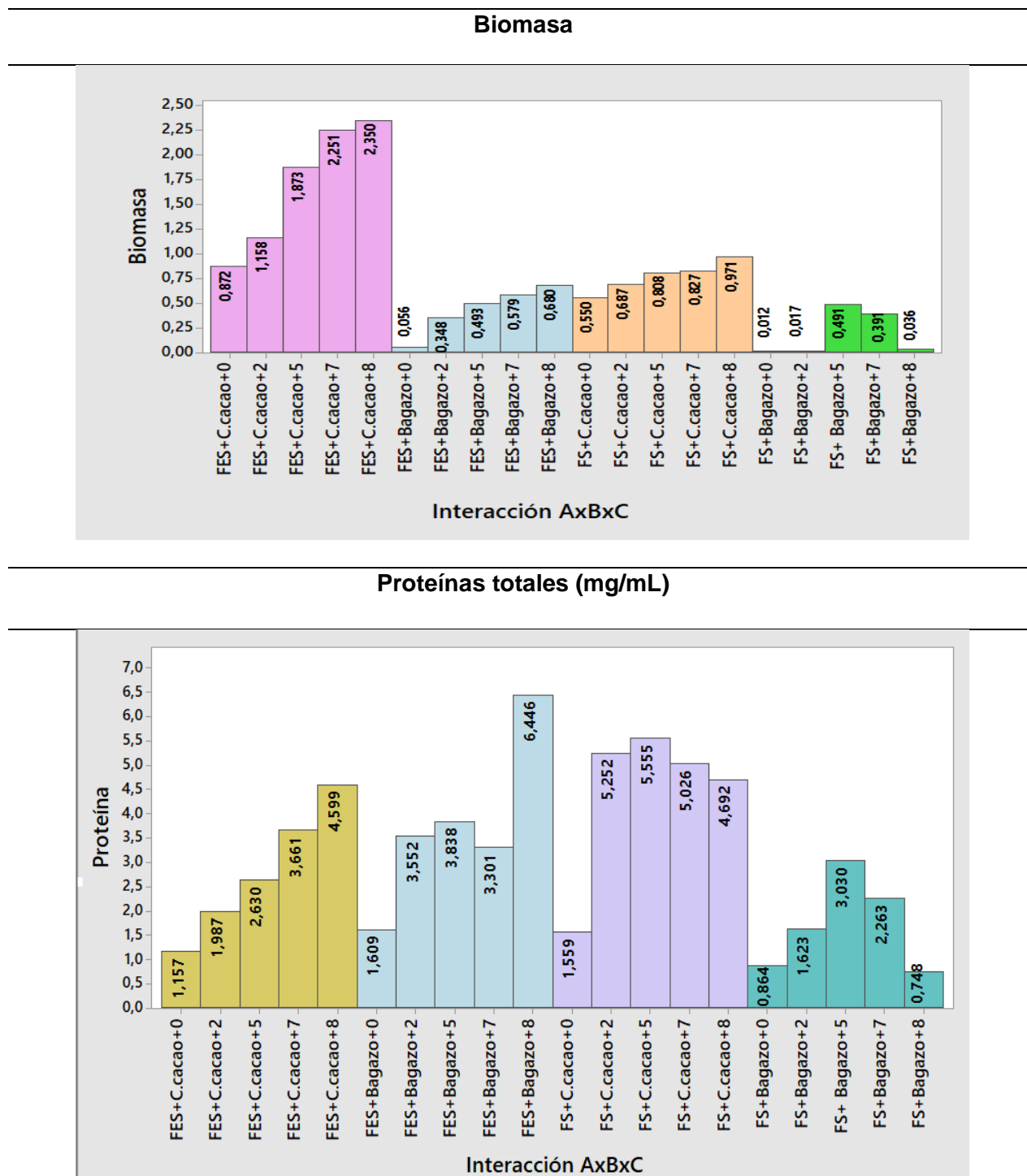
*Prueba de significancia (Tukey $p \leq 0.05$) para Interacción A*B*C*

Interacción ABC	Biomasa	Proteínas	Ácido indol acético
F.Sólida+Cáscaras de cacao+D0	0,872 ^K	1,157 ^{AB}	11,780 ^B
F.Sólida+Cáscaras de cacao+D2	1,158 ^M	1,987 ^{ABCD}	29,268 ^G
F.Sólida+Cáscaras de cacao+D5	1,873 ^N	2,630 ^{ABCDEF}	73,555 ^I
F.Sólida+Cáscaras de cacao+D7	2,251 ^O	3,661 ^{BCDEFGH}	86,906 ^J
F.Sólida+Cáscaras de cacao+D8	2,350 ^P	4,599 ^{EFGHI}	96,588 ^K
F.Sólida+Bagazo de caña+D0	0,056 ^C	1,609 ^{ABCD}	17,565 ^C
F.Sólida+Bagazo de caña+D2	0,348 ^D	3,552 ^{BCDEFGH}	97,798 ^K
F.Sólida+Bagazo de caña+D5	0,493 ^F	3,838 ^{CDEFGH}	152,142 ^L
F.Sólida+Bagazo de caña+D7	0,579 ^H	3,301 ^{ABCDE}	185,690 ^M
F.Sólida+Bagazo de caña+D8	0,680 ^I	6,446 ^I	207,560 ^N
F.Sumergida+Cáscaras de cacao+D0	0,550 ^G	1,559 ^{ABC}	7,033 ^A
F.Sumergida+Cáscaras de cacao+D2	0,687 ^I	5,252 ^{GHI}	15,900 ^C
F.Sumergida+Cáscaras de cacao+D5	0,808 ^J	5,555 ^{HI}	22,759 ^{DE}
F.Sumergida+Cáscaras de cacao+D7	0,827 ^J	5,026 ^{FGHI}	27,302 ^{FG}
F.Sumergida+Cáscaras de cacao+D8	0,971 ^L	4,692 ^{EFGHI}	22,821 ^{DE}
F.Sumergida+Bagazo de caña+D0	0,012 ^A	0,864 ^A	7,480 ^A
F.Sumergida+Bagazo de caña+D2	0,017 ^{AB}	1,623 ^{ABCD}	19,288 ^{CD}
F.Sumergida + Bagazo de caña + D5	0,491 ^F	3,030 ^{ABCDEFG}	25,429 ^{EF}
F.Sumergida+Bagazo de caña+D7	0,391 ^E	2,263 ^{ABCDE}	34,197 ^H
F.Sumergida+Bagazo de caña + D8	0,036 ^{BC}	0,748 ^A	29,059 ^{FG}

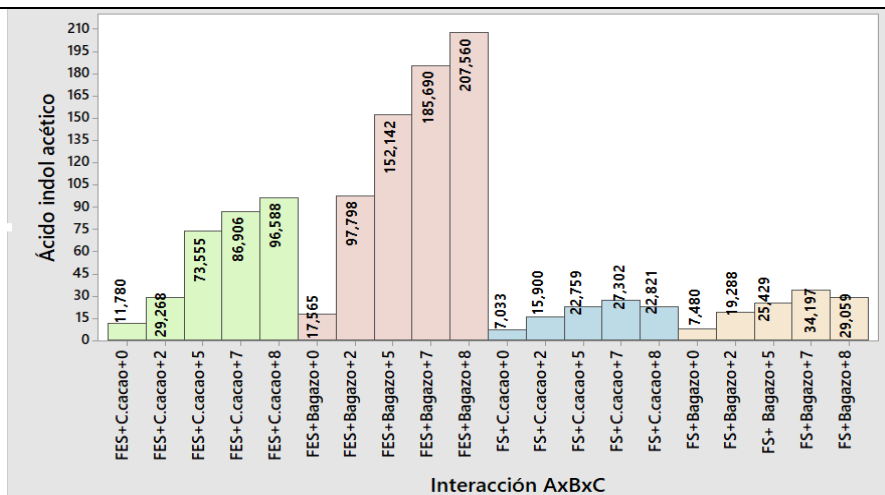
Nota: Considerar valor de $p \leq 0.05$

Figura 17

Prueba de significancia de Tukey ($p \leq 0.05$) para Interacción A*B*C (Tipo de fermentación*Tipo de sustrato*Días de medición)



Ácido indol acético ($\mu\text{g}/\text{mg}$)



Nota. Diagrama de barras de los medios de cultivos.

En la tabla 29 se observa los diferentes grupos homólogos que se encontraron en cada uno de los tratamientos que fueron evaluados mediante la interacción AxBxC, por lo cual se determinó que los mejores resultados en cuanto a biomasa producida se presentaron en el tratamiento de Fermentación sólida+ cáscaras de cacao al día 8, en el caso de proteínas totales y ácido indol acético se determinó que el tratamiento de Fermentación sólida + bagazo de caña al día 8 es el más óptimo.

En cuanto a las medias obtenidas para la biomasa, se determinó que el grupo A conformado por las interacciones de fermentación sumergida+ Bagazo de caña+ D0 (0,012) y fermentación sumergida con bagazo de caña al día 2 (0,017) presentaron valores bajos en cuanto a la producción de biomasa, mientras que en el grupo P conformado por la interacción Fermentación Sólida + Cáscaras de cacao+ D8 (2,350), se obtuvo el valor más alto, en el caso de obtención de biomasa en la fermentación sumergida, se encontró que el valor más alto se lo puedo obtener al aplicar cáscaras de cacao durante 8 días de fermentación (0,971).

Con respecto a los resultados de proteínas totales se determinó que en la fermentación sólida utilizando como sustrato el bagazo de caña al día 8, se obtiene un mejor rendimiento en la obtención de proteínas, ya que se encontró un total de 6,446 mg/mL, por otro lado, para la

fermentación sumergida se obtuvo que la mayor concentración de proteínas se encontraba aplicando cáscaras de cacao durante 5 días de fermentación (5,555 mg/mL). Asimismo, mediante los resultados obtenidos se determinó que el menor rendimiento en la obtención de proteínas se encontraba al usar fermentación sumergida con bagazo de caña al día 8 (0,748 mg/mL) y fermentación sólida con cáscaras de cacao al día 0 (1,157 mg/mL).

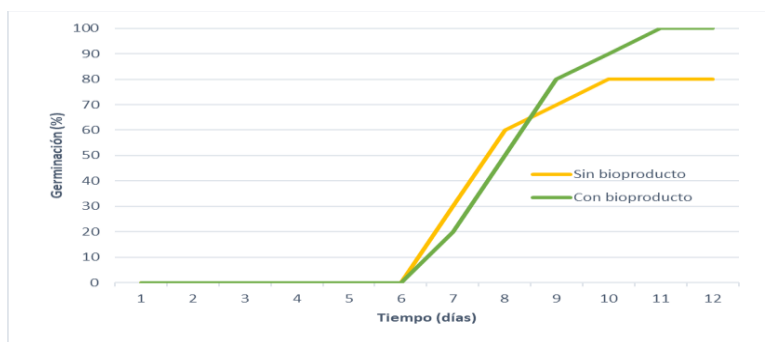
Por último, en los resultados obtenidos con respecto a la presencia de ácido indol acético, se encontró que el mejor tratamiento es al aplicar una fermentación sólida con bagazo de caña durante 8 días de fermentación, ya que a este día se puede encontrar una concentración de AIA de 207,560 $\mu\text{g}/\text{mg}$, mientras que, al utilizar una fermentación sumergida, la mayor concentración de AIA se puede encontrar al día 7 usando como sustrato el bagazo de caña (34,197 $\mu\text{g}/\text{mg}$). En cuanto a los datos desfavorables, se determinó que en la fermentación sumergida en el día 0, usando cáscaras de cacao y bagazo de caña como sustrato, se obtuvo concentraciones de 7,033 $\mu\text{g}/\text{mg}$ y de 7,480 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectivamente.

Evaluación del producto en cultivo *in vitro* de *Capsicum chinense*.

Las semillas de ambos grupos evaluados empezaron a germinar al séptimo día, en donde, el grupo de semillas tratadas con el bioproducto presentó un 20% de germinación, mientras que, en el grupo de semillas sin el bioproducto se obtuvo un porcentaje de germinación de 30%. Al octavo día los valores fueron de 50% y 60% de germinación para las semillas tratadas y sin tratar con el bioproducto, respectivamente. Al onceavo día de la siembra, se completó el proceso de germinación en ambos ensayos, teniendo que, el 100% de las semillas tratadas con el bioproducto lograron germinar, mientras que, en las semillas sin tratar, se obtuvo un 80% de germinación como se muestra de la figura 18.

Figura 18

Porcentaje de germinación de semillas



Nota: Evolución diaria de las semillas de *Capsicum chinense* tratadas y sin tratar con el bioproducto obtenido mediante FES de bagazo de caña con *Trichoderma* spp.

Las raíces de las semillas de *Capsicum chinense* tratadas con el bioproducto mostraron un abundante crecimiento de pelos radiculares (Figura 19 A y B), mientras que en las raíces de las semillas de ají que no fueron tratadas con el bioproducto se observó una cantidad mucho menor de pelos radiculares (Figura 19 C y D).

Figura 19.

Evaluación del bioproducto en semillas

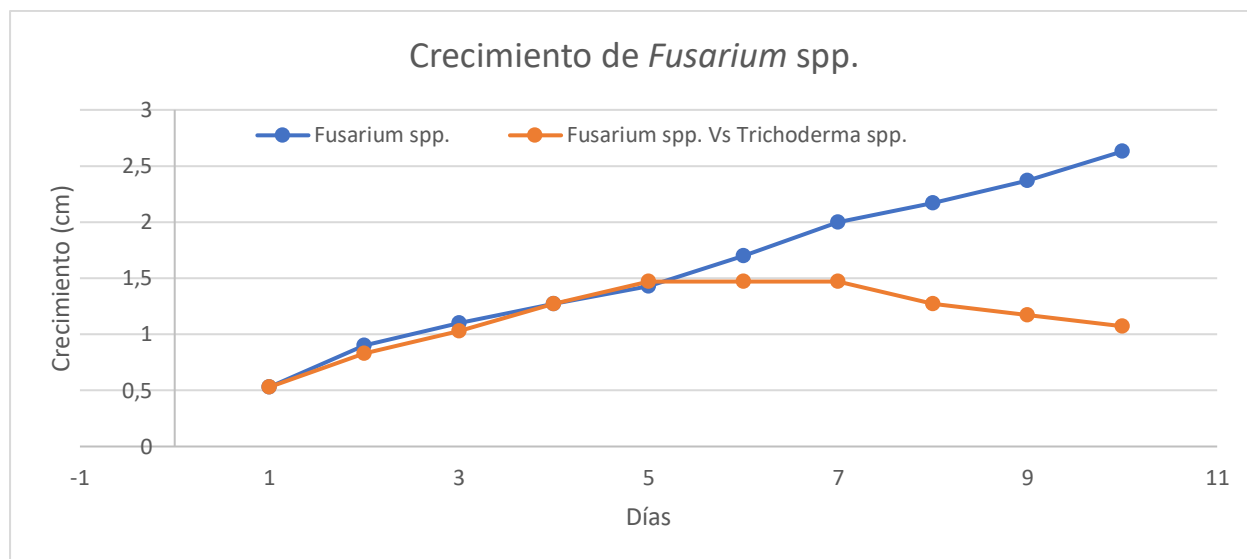


Nota: Aplicación del bioproducto en el cultivo *in vitro* de *Capsicum chinense* (A y B semillas tratadas con bioproducto; C y D semillas sin tratar con el bioproducto)

Evaluación del efecto antagonista de la cepa nativa de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp.

Figura 20

Crecimiento de *Fusarium* spp.

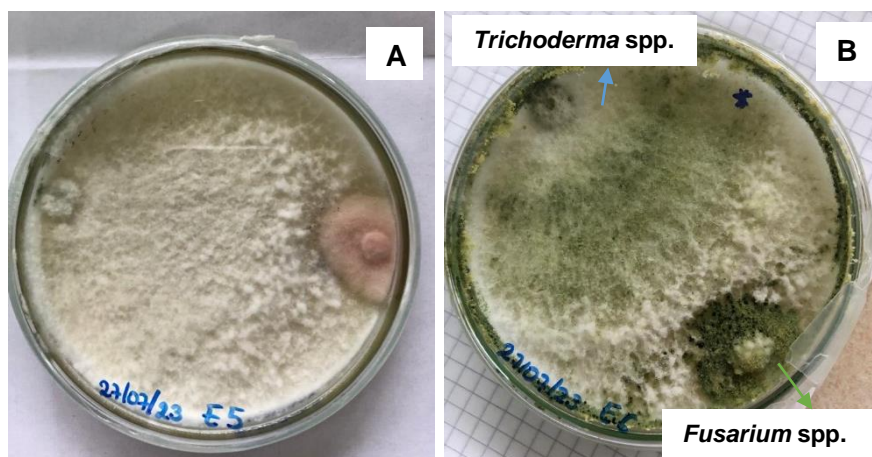


Nota: Gráfico de crecimiento diario de la cepa de *Fusarium* spp., y crecimiento de *Fusarium* spp. frente a *Trichoderma* spp. en el ensayo de antagonismo.

Se observó que el crecimiento del hongo *Fusarium* spp. fue muy similar durante los 5 primeros días tanto en el testigo como en el enfrentamiento con *Trichoderma* spp. (Figura 20), sin embargo, al día 6 el *Fusarium* spp. de la placa testigo continuó creciendo mientras que el *Fusarium* spp. del enfrentamiento se quedó del mismo tamaño que el día anterior, debido a que estaba en contacto con el micelio de *Trichoderma* spp. (Figura 21 A) y no quedaba más medio disponible para su crecimiento. Al octavo día, el micelio de *Trichoderma* spp. empezó a crecer por encima del micelio de *Fusarium* spp. y al día 10 *Fusarium* spp. del enfrentamiento fue completamente cubierto por *Trichoderma* spp (Figura 21 B). mientras que *Fusarium* spp. del control continuó creciendo. De tal manera se determinó que el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* spp. al décimo día fue de 61,43%.

Figura 21

Antagonismo de Trichoderma spp. frente a Fusarium spp.



Nota: Efecto antagonista de la cepa nativa de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp.

Trichoderma spp. y *Fusarium* spp. crecieron normalmente en comparación con los testigos, hasta el día 5, en donde ambos hongos entraron en contacto. Al sexto día *Trichoderma* spp. del control cubrió el medio de la placa Petri. Mientras que, al octavo día en las placas del enfrentamiento, *Trichoderma* spp. empezó a crecer por encima de *Fusarium* spp. y al día 10 *Trichoderma* spp. cubrió por completo la placa (Figura 21 B), realizando un antagonismo de clase 1.

Capítulo V

Discusión

Respecto a la muestra de suelo y la importancia de una cepa nativa

La muestra de suelo para aislar la cepa nativa de *Trichoderma* spp. se obtuvo a partir de un área boscosa sin intervención agrícola y cavando cerca de la base de los árboles, debido a investigadores como (Racić et al., 2023), mencionan que estos son hongos filamentosos que se pueden encontrar con cierta facilidad en la rizosfera de las plantas ubicadas en suelos tropicales con abundante materia orgánica, ya que se encuentran en constante interacción con las plantas. Incluso en suelos arenosos (Migheli et al., 2009), lograron aislar cerca más de 100 cepas de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelos perturbados y no perturbados como bosques y matorrales. De igual manera, (Carreras-Villaseñor et al., 2012) , sostienen que las especies de *Trichoderma* spp. son hongos de vida libre que se suelen establecer en ecosistemas de suelo y raíces, y tiene una amplia variedad de aplicaciones industriales y biotecnológicas.

Este no solo se encuentra en Sudamérica, sino que se encuentra extendido en casi todo el mundo. Debido a su importancia y efectividad para el biocontrol de fitopatógenos, (Yu et al., 2021), aislaron 10 cepas nativas de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelo de la rizosfera, obtenidas en la provincia de Heilongjiang en el noreste de China. Al igual que en este estudio, en muchas investigaciones se han realizado aislados de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en una constante búsqueda de cepas más robustas, agresivas y que se adapten mejor a una amplia variedad de condiciones climáticas, para combatir de manera eficiente, hongos, bacterias e incluso nemátodos que atacan a los cultivos.

Los hongos del género *Trichoderma* spp. se pueden utilizar como herramientas de biocontrol de plagas y enfermedades en los cultivos, y las cepas nativas tienen mayor efectividad atacando y controlando a los fitopatógenos de la zona, es por ello por lo que en

investigaciones como la de (Naglot et al., 2015), aislaron cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. a partir de la rizosfera de árboles de té en el nororiente de India para aplicarlas en los cultivos de té y realizar el biocontrol de *Pestalotia theae* y *Fusarium solani*. De igual manera, en Irán, (Khalili et al., 2012), realizaron el biocontrol de la mancha marrón del arroz utilizando tres aislados de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en donde lograron controlar significativamente los fitopatógenos y aumentaron el crecimiento de las plantas. (Galarza et al., 2015), mencionaron que, en Ecuador hasta ese año, se aislaron 30 cepas nativas de *Trichoderma* spp. como *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. virens* y *T. reesei*, las cuales demostraron sus capacidades antagónicas al ser enfrentadas contra fitopatógenos.

Respecto a la siembra, purificación e identificación

La muestra de suelo se sembró por el método de diluciones seriadas hasta obtener la dilución 1×10^{-5} y la siembra se realizó en PDA acidulado, como en el estudio realizado por (Naglot et al., 2015), en el cual obtuvieron cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelo, utilizando el mismo método de dilución y medio de cultivo, ya que este es un método común para sembrar muestras donde existe una alta carga microbiana, mediante el cual se reduce la cantidad de microorganismos. Además, se realizó una acidificación del medio con ácido láctico con la finalidad de darle ventaja a *Trichoderma* spp. sobre los demás hongos e impedir el crecimiento de bacterias, ya que (Steyaert et al., 2010), señalaron que este hongo se ve favorecido por un pH bajo. (Khalili et al., 2012), también realizaron diluciones seriadas de muestras de suelo hasta obtener la dilución 10^{-5} y utilizaron PDA como medio de cultivo, para obtener cepas nativas de este hongo.

De todos los hongos que crecieron en el medio de cultivo, las colonias de *Trichoderma* spp. se identificaron macroscópicamente por la forma y coloración verde del micelio, y se purificaron mediante técnicas de repique y siembra en nuevo medio de cultivo, como en el

estudio realizado por (Naglot et al., 2015), en donde identificaron morfológicamente cepas de *Trichoderma* spp. y las purificaron en nuevo medio.

En la identificación morfológica del hongo, se logró clasificarlo como una cepa nativa perteneciente al género *Trichoderma* spp., ya que al analizar las tinciones del micelio bajo el microscopio se observó estructuras como hifas, conidióforos, conidios, clamidosporas, entre otros, y en base a estas estructuras se determinó que la reproducción de la cepa nativa de *Trichoderma* spp. era asexual, ya que en un estudio realizado por (Castro-Gómez, 2015) menciona que las estructuras de la reproducción asexual de *Trichoderma* son los conidios y las estructuras de resistencia como las clamidosporas.

Respecto al medio de cultivo

En todos los tratamientos se utilizó L-Triptófano, un medio mínimo conformado por varios macro y micronutrientes, y residuos agroindustriales de la zona como fuente de carbono, ya que esta es la técnica que normalmente se utiliza para fermentar algún sustrato con este tipo de hongos, como se evidencia en el protocolo usado por (Vargas-Hoyos y Gilchrist-Ramelli, 2015), en el cual, evaluaron el crecimiento de *Trichoderma* spp. en distintos sustratos, para lo cual, prepararon un medio mínimo de cultivo, suplementado con una única y distinta fuente de carbono, teniendo así: MM+almidón, MM+Pared celular de *Rhizoctonia solani*, MM+quitina coloidal y MM+laminaria, y se cultivaron a 28°C con agitación constante a 140 rpm. De igual manera (Romero-Cortes et al., 2016), en su investigación para evaluar el micoparasitismo de *Trichoderma harzianum* frente al fitopatógeno *Cladosporium cladosporioides* utilizaron un medio mínimo compuesto de: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl, NH_4NO_3 , $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgCl_2 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, y como fuente de carbono utilizaron el micelio molido de tres cepas de *Cladosporium* spp. En este tipo de investigaciones en donde se busca evaluar el metabolismo de un hongo como *Trichoderma* spp. sobre algún subproducto o residuo agroindustrial, primero

se prepara un medio mínimo el cual se aplica de forma homogénea en todos los tratamientos y una fuente de carbono a evaluar.

Respecto a los sustratos utilizados

Para las fermentaciones con *Trichoderma* spp. se optó por aprovechar residuos agroindustriales de la zona como el bagazo de caña de azúcar y cáscaras de mazorca de cacao CCN-51, puesto que estos residuos son desechados y no reciben ningún tratamiento. En un estudio realizado por (Morales-Paredes et al., 2023), mencionan que la gestión y manejo de los residuos agroindustriales son una grave problemática ambiental en países subdesarrollados como Ecuador, en donde anualmente se originan cerca de 20 millones de toneladas, las cuales no son aprovechadas, sin embargo, se podrían reingresar a la cadena productiva mediante la obtención de energía, combustibles, sustancias químicas, fertilizantes y otros productos de alto valor agregado.

Los residuos agroindustriales son subproductos que se obtienen después de procesar materias primas agrícolas para obtener algún producto final y por lo general están compuestos por restos de cáscaras, semillas, tallos, hojas, fibras y otros desechos. Esta biomasa celulósica, según (Nanjundaswamy y Okeke, 2020), está conformada por macromoléculas de gran tamaño como lignina, celulosa y hemicelulosa las cuales tienen el potencial de ser convertidas en combustibles o sustancias de alto valor mediante el uso de microorganismos. Además, investigadores como (Troiano et al., 2022), mencionaron que utilizar residuos como fuente para la obtención de nuevos productos permite obtener una economía más circular, es por ello que en su investigación lograron producir pigmentos mediante la fermentación sólida de residuos de alimentos con un hongo filamentoso.

Respecto a las fermentaciones evaluadas

La fermentación sumergida y la fermentación sólida con *Trichoderma* spp. utilizando cáscaras de cacao y bagazo de caña de azúcar resultó viable debido a que el hongo tiene la

habilidad para metabolizar residuos agroindustriales con alto contenido de lignina y celulosa. (Guo et al., 2022), señalan que *Trichoderma* spp. cuenta con más de 250 especies, las cuales tienen la capacidad de producir una amplia variedad de enzimas. Asimismo, (Adnan et al., 2022), sostienen que los hongos filamentosos son los organismos más eficientes para la bioconversión de biomasa vegetal, y son muy usados a nivel industrial en la producción de proteínas, y *Trichoderma* spp. es el principal productor de celulosa comercial. (Alias et al., 2022), describen a los residuos agroindustriales como un sustrato ideal para obtener bioproductos mediante fermentación, ya que estos tienen un bajo costo, alta disponibilidad y permiten tener un mejor crecimiento de los microorganismos, debido a la amplia variedad de nutrientes que resultan ser beneficiosos para el cultivo de *Trichoderma* spp.

Respecto a la mejor fermentación con *Trichoderma* spp.

La fermentación en estado sólido con *Trichoderma* spp. en ambos sustratos (cáscaras de cacao y bagazo de caña de azúcar), mostró mejores resultados en comparación a la fermentación sumergida, ya que produjo una mayor cantidad de biomasa, proteínas y AIA, coincidiendo con lo obtenido por (Nanjundaswamy y Okeke, 2020), los cuales compararon la fermentación en estado sólido con la fermentación sumergida utilizando *Trichoderma* spp. y obtuvieron una mayor conversión de biomasa y producción de enzimas mediante la fermentación en estado sólido.

Según (Poalacin, 2015), esto se debe a que los hongos filamentosos están mejor adaptados a los sustratos sólidos, es por ello por lo que tienden a crecer de mejor manera en la FES, además, la reducida cantidad de agua libre facilita la esterilización del sustrato y reduce el riesgo de contaminación por levaduras y bacterias. Otros investigadores como (Alias et al., 2022), mencionan que la FES es una herramienta biotecnológica cuyos parámetros y condiciones se acoplan muy bien a la fisiología natural de los hongos, en comparación con la

FS, permitiendo obtener elevadas cantidades de biomasa o productos de alto valor con un reducido impacto ambiental.

A pesar de que en muchas industrias se utilice la fermentación sumergida como principal método para la producción de enzimas, la FES ha demostrado ser mucho más eficiente, es por ello que investigadores como (Li et al., 2013), al realizar una comparación entre ambos tipos de fermentación, encontraron que la producción de enzimas fue mucho mayor mediante la FES que con FS, debido a que la FES se asemeja más a las condiciones naturales en las que crecen normalmente los hongos filamentosos, lo cual facilita la secreción de enzimas.

(Baldoni et al., 2020), sostienen que, la FES para la producción de enzimas es un proceso eficiente que deja una reducida cantidad de residuos, es relativamente fácil de realizar y que conlleva bajos costos, que permite la reutilización de una amplia variedad de subproductos de la agroindustria, además, en la FES a diferencia de la FS, las condiciones para el crecimiento de los hongos filamentosos son más semejantes a las condiciones presentadas en la naturaleza, en donde, el sustrato posee una baja cantidad de agua, permitiendo que la bioconversión de la biomasa sea más fácil que en la FS. Además, la FES se puede pasar fácilmente a escalas más grandes, para obtener compuestos bioactivos de alto valor de manera rentable y eficiente, gracias a que el hongo filamentosos se extiende fácilmente sobre el sustrato, atravesando los espacios entre las partículas, teniendo un mayor metabolismo y, por ende, un aumento en la secreción de enzimas (Cui et al., 2021).

Respecto a las condiciones de la fermentación en estado sólido

En la fermentación en estado sólido aplicando los dos sustratos orgánicos se mantuvieron las condiciones de humedad durante todo el proceso, ya que, según (Volpi et al., 2019), en la FES utilizando sustratos que contienen alto porcentaje de fibra se debe mantener la humedad aproximadamente en un 65%, puesto que, si la humedad es inferior, se limita el

acceso a todo el sustrato y nutrientes, dando como resultado la reducción del crecimiento de los hongos. Según (Narwade et al., 2023), en la FES se debe promover la producción de esporas, para lo cual se usan equipos que mantengan la FES en constante agitación, es por ello por lo que en la FES con *Trichoderma* spp. se utilizó agitación de manera intermitente, durante los 8 días de la fermentación.

Respecto a las variables evaluadas

Trichoderma spp. logró producir una mayor cantidad de proteínas y AIA en la FES con bagazo de caña de azúcar al octavo día, en comparación con la fermentación sumergida. Esto se atribuye a que el hongo posee una estructura biológica muy bien adaptada para ser un colonizador agresivo en una amplia variedad de sustratos. (Ries et al., 2013), sostienen que *Trichoderma* spp. es un hongo filamentoso que tiende a desarrollarse de mejor manera en sustratos sólidos y ricos en lignocelulosa y fibra, debido a que tiene la capacidad de secretar enzimas que descomponen estas estructuras, y es por ello por lo que especies del género *Trichoderma* son muy utilizadas a nivel industrial en la producción de enzimas.

Las cáscaras de la mazorca del cacao contienen cierta cantidad de fibra y lignocelulosa, sin embargo, el contenido es menor en comparación con en el bagazo de la caña de azúcar. Según un estudio realizado por (Loayza-Calva, 2020), encontró que la cáscara de la mazorca del cacao contiene 29.07% de celulosa, 2.97% de hemicelulosa y 33.90% de lignina, mientras que Alvarado (2021), encontró que el bagazo de caña está compuesto aproximadamente por un 41-44% de celulosa, 25-27% de hemicelulosa y 20-22% de lignina. El mayor contenido de fibra y lignocelulosa que se encuentra en el bagazo de la caña de azúcar explica el motivo por el cual el metabolismo de *Trichoderma* spp. fue superior en la FES con este residuo agroindustrial.

En la fermentación sólida con bagazo de caña al octavo día se obtuvo una concentración de proteína de 6,446 mg/mL, este valor se asemeja a los resultados obtenidos

en un estudio realizado por (Valiño et al., 2004), en el cual usaron fermentación sólida con *Trichoderma viride* M5-2 sobre bagazo de caña y observaron que el porcentaje de proteínas aumentó 6.4 veces con respecto al control, teniendo como resultado 6,5 mg/g de MS a las 96 horas.

Además, en otra investigación realizada por (Pozo-Enríquez, 2020), se probaron tres sustratos lignocelulósicos los cuales fueron bagazo de caña de azúcar, tamo de fréjol y cascarilla de café, mediante FES con *Trichoderma asperellum* para aumentar el contenido proteico, al finalizar el estudio obtuvo que el mejor sustrato fue el bagazo de caña, ya que logró aumentar más del 80% la concentración de proteína bruta, por lo cual concluyó que este es un hongo lignívoro y que también tiene la capacidad de degradar fibra, lo cual indica que *Trichoderma* spp. crece muy bien en bagazo de caña de azúcar, en donde degrada este sustrato lignocelulósico de manera eficiente.

En otro estudio realizado por (Pandey et al., 2000), mencionan que, mediante herramientas biotecnológicas como la FES con *Trichoderma* spp. se puede aprovechar residuos agroindustriales muy valiosos, pero a la vez complejos como el bagazo de caña de azúcar, del cual, la mitad de su contenido está conformado por celulosa, una cuarta parte por hemicelulosa y la cuarta parte restante por lignina. Se usa este hongo porque, según (Marx et al., 2013), varias especies de *Trichoderma* spp. tienen una alta capacidad de producir enzimas involucradas en la degradación eficiente del bagazo de caña de azúcar y de otros polisacáridos. Además, *Trichoderma* spp. es el microorganismo con la mayor capacidad de degradar sustratos lignocelulósicos debido a que posee un sistema completo para la degradación de los principales polisacáridos, por lo que es muy utilizado por las industrias para la producción de celulasas, hemicelulasas y otras enzimas (Nogueira et al., 2018).

Por otro lado, se logró producir 207,560 µg/mg de AIA a través de la fermentación de sustratos orgánicos con *Trichoderma* spp. en un medio suplementado con L-Triptófano. Los resultados son respaldados por una investigación realizada por (Nieto-Jacobo et al., 2017), en

donde encontraron que la mayoría de las especies del género *Trichoderma* presentan la capacidad de producir ácido indol acético, la cual es una fitohormona que promueve el crecimiento radicular, asimismo, los mismos autores sostienen que los mecanismos de producción de esta fitohormona requieren de L-Triptófano porque su adición en los medios de cultivo puede llegar a aumentar la concentración de AIA al final de la fermentación. Esto es respaldado por un estudio realizado por (Salas-Marina et al., 2011), en donde, encontraron que al suplementar el medio con L-Tryp, *Trichoderma atroviride* produjo más del doble de AIA cuando no se suplementa el medio con L-Tryp, asimismo, en otro estudio por (Contreras-Cornejo et al., 2009), utilizaron L-Triptófano en el medio de crecimiento de *T. virens* a una concentración de 100 mg/L, y observaron que la producción de AIA aumentó 17 veces. Es por ello por lo que el medio para la fermentación de los residuos agroindustriales se suplementó con L-Triptófano, con la finalidad de aumentar la producción del AIA.

Respecto la evaluación del bioproducto en *Capsicum chinense*

En el cultivo *in vitro* de las semillas de *Capsicum chinense* tratadas con el bioproducto, se evidenció el crecimiento de raíces laterales, mientras que, en las semillas sin tratar con el bioproducto, la raíz de la planta no presentó crecimiento de vello radicular. Los resultados obtenidos son respaldados por (Contreras-Cornejo et al., 2009), ya que en su ensayo *in vitro* encontraron que *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* producen AIA y demostraron que promueven y aumentan el crecimiento de raíces laterales, ya que, al suplementar con el AIA, las raíces formaron una gran cantidad de vellos radiculares.

Según (Alias et al., 2022), el género *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas mediante la secreción de fitohormonas, degradación de la materia orgánica y haciendo que las plantas toleren de mejor manera el estrés biótico y abiótico. (Contreras-Cornejo et al., 2016), mencionan que los metabolitos liberados por *Trichoderma*

spp. pueden ser absorbidos fácilmente por las raíces de las plantas e influir en su desarrollo, es por ello que, en cultivos *in vitro* esto se vuelve mucho más notorio, puesto que mejora la germinación de las semillas, ramificación de las raíces y aumento del crecimiento de la planta. De igual manera, el mismo autor menciona que se han reportado aumentos significativos del crecimiento en plantas de tomate, donde la altura aumentó cerca del 30% y el peso cerca del 10%, en plantas de maíz se reporta un aumento del 70% del área foliar, y del 90 al 100% del peso, en la raíz de plántulas de repollo un aumento de entre 100 a 150% del peso de la raíz, y en cultivos de pimiento, bioproductos a base de *Trichoderma* aumentaron del 200 a 300% la producción.

En otro estudio realizado por (Xie et al., 2023), para evaluar el efecto del microorganismo como potenciador del crecimiento de las plantas, realizaron un protocolo en donde recubrieron las semillas con *Trichoderma guizhouense* NJAU4742 y observaron resultados favorables en cuanto a la germinación de las semillas, aumento de la longitud de la raíz principal y el aumento de las raíces laterales de la planta. De igual manera, (Matar et al., 2022), resaltan que el recubrimiento de las semillas con especies de *Trichoderma* ayuda a mejorar el estrés fisiológico y la latencia de las semillas, ya que estas especies producen ácido indol acético el cual ayuda a la diferenciación celular, crecimiento del tejido vegetal y síntesis de ciertas proteínas.

Respecto al efecto antagónico de *Trichoderma* spp.

En los datos obtenidos para evaluar el efecto antagónico de la cepa nativa frente a *Fusarium* spp., se encontró que el antagonismo de *Trichoderma* spp es de clase 1 y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* fue de 61,43%. Los datos obtenidos son corroborados por los resultados de una investigación realizada por (Qin et al., 2011), en donde, observaron que *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* obtuvieron más del 80%

de la tasa de inhibición de *Fusarium solani*, por lo cual concluyeron que este porcentaje de inhibición representa la clase 1 de antagonismo.

Según (Yu et al., 2021), este hongo realiza el biocontrol de fitopatógenos mediante mecanismos como la competencia, el antibiotismo y el micoparasitismo. Según (Contreras-Cornejo et al., 2016), los hongos del género *Trichoderma* spp. pueden micoparasitar una amplia variedad de hongos fitopatógenos, entre ellos *Fusarium* spp., para lo cual realiza un reconocimiento del hongo a parasitar, se apega a este, realiza un enrollamiento alrededor de las hifas y, por último, realiza un ataque en el cual segrega metabolitos que degradan y eliminan al fitopatógeno.

En un estudio realizado por (Jaroszuk-Ścisel et al., 2019), sostienen que las hifas de las especies de *Trichoderma* reconocen a su huésped y crea una espiral alrededor de las hifas del fitopatógeno, formando una especie de gancho que penetra la pared celular del huésped mediante la secreción de enzimas que degradan la pared celular. (Tyśkiewicz et al., 2022), argumentan que la secreción de enzimas por parte de las especies de *Trichoderma* es la etapa final del micoparasitismo, ya que las especies de este género tienen la capacidad de secretar enzimas líticas como proteasas, quitinasas y glucanasas, las cuales tienen la función de degradar la pared celular de los hongos, la cual está compuesta por un 90% de polisacáridos como quitina, glucanos, proteínas, entre otros.

Capítulo VI

Conclusiones

Al culminar el presente trabajo se demostró de manera exitosa la obtención de un bioproducto a partir de fermentaciones de residuos agroindustriales con la cepa nativa de *Trichoderma* spp.

Fue posible obtener una cepa nativa perteneciente al género *Trichoderma* spp. a partir de una muestra de suelo tomada de una zona boscosa sin intervención agrícola, utilizando el método de diluciones seriadas y medio de cultivo PDA, y la identificación de la cepa nativa de *Trichoderma* spp. se pudo realizar gracias a las características morfológicas observadas a nivel macroscópico como coloración y forma del micelio, y a estructuras microscópicas típicas de este hongo hermafrodita e imperfecto como hifas, conidios, conidióforos y clamidosporas.

En base a los resultados obtenidos del proceso de fermentación se concluye que la fermentación en estado sólido con bagazo de caña de azúcar al octavo día fue el mejor proceso para obtener el bioproducto, ya que en este se obtuvo una mayor concentración de AIA debido a que *Trichoderma* spp. está mejor adaptado a los sustratos sólidos con un alto contenido de lignocelulosa.

El bioproducto evaluado en el cultivo in vitro de *Capsicum chinense* demostró mejorar el proceso de germinación de las semillas y estimular la producción de pelos radiculares, debido a que contenía la fitohormona ácido indol acético, la cual es conocida por estimular el crecimiento de las raíces de las plantas.

La cepa nativa de *Trichoderma* spp. aislada en el presente estudio demostró ser efectiva para el biocontrol al haber sido enfrentada con el hongo fitopatógeno *Fusarium* spp. en cultivos duales, en el cual, *Trichoderma* spp. utilizó como mecanismo de acción la competencia por espacio y nutrientes durante los primeros días y el micoparasitismo, mediante el cual erradicó por completo al fitopatógeno.

Recomendaciones

Se recomienda seguir aislando cepas nativas de la zona, ya que estas resultan ser más eficientes para controlar una amplia variedad de plagas en los cultivos.

Se recomienda realizar estudios con la cepa nativa en fases de invernadero y campo con plantas de la zona sensibles al ataque de fitopatógenos para probar la efectividad de esta cepa nativa como agente de control biológico, y de igual manera, se recomienda realizar ensayos *in vitro* de la cepa nativa frente a otros fitopatógenos para evaluar su efecto antagónico.

Si se busca producir AIA con *Trichoderma* spp., se recomienda utilizar el método de fermentación en estado sólido utilizando bagazo de caña de azúcar suplementado con L-Triptófano.

Se recomienda probar diferentes concentraciones del aminoácido precursor del ácido 3-indol-acético (L-Triptófano), con la finalidad de conocer cuál es la mejor concentración de este aminoácido para obtener una mayor cantidad de AIA en el bioproducto.

Se recomienda probar una mayor variedad de residuos agroindustriales de la zona para evaluar en cuál de ellos el hongo *Trichoderma* spp. puede llegar a crecer de mejor manera, y, por ende, producir una mayor cantidad de biomasa, proteínas o ácido 3-indol-acético.

Se recomienda evaluar el bioproducto en cultivos *in vivo*, durante una mayor cantidad de tiempo probando diferentes dosificaciones, para evaluar el efecto de este en el crecimiento de la raíz, número de hojas y peso de las plantas.

Capítulo VII

Bibliografía

- Adnan, M., Ma, X., Olsson, S., Wang, J., y Liu, G. (2022). Promoter regulation and genetic engineering strategies for enhanced cellulase expression in *Trichoderma reesei*. *Microbiological Research*, 259, 127011. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127011>
- Alfiky, A., y Weisskopf, L. (2021). Deciphering *Trichoderma*-Plant-Pathogen Interactions for Better Development of Biocontrol Applications. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(1), 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>
- Alias, C., Bulgari, D., y Gobbi, E. (2022). It Works! Organic-Waste-Assisted *Trichoderma* spp. Solid-State Fermentation on Agricultural Digestate. *Microorganisms*, 10(1), 164. <https://doi.org/10.3390/microorganisms1001016>
- Andrzejak, R., y Janowska, B. (2022). *Trichoderma* spp. Improves Flowering, Quality, and Nutritional Status of Ornamental Plants. *International journal of molecular sciences*, 23(24), 15662. <https://doi.org/10.3390/ijms232415662>
- Azevedo, D. S., Taveira, G. B., da Silva, M. S., da Silva-Gebara, R., da Silva-Pereira, L., Perales, J., . . . Gomes, V. M. (2020). Antimicrobial peptides from *Capsicum chinense* fruits: agronomic alternatives against phytopathogenic fungi. *Bioscience reports*, 40(8), BSR20200950. <https://doi.org/10.1042/BSR20200950>
- Bai, B., Liu, C., Zhang, C., He, X., Wang, H., Peng, W., y Zheng, C. (2023). *Trichoderma* species from plant and soil: An excellent resource for biosynthesis of terpenoids with versatile bioactivities. *Journal of Advanced Research*, 49, 81-102. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.09.010>
- Baldoni, D. B., Antonioli, Z. I., Mazutti, M. A., Jacques, R. J., Dotto, A. C., Oliveira-Silveira, d., . . . de Souza, A. R. (2020). Chitinase production by *Trichoderma koningiopsis* UFSMQ40

- using solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(4), 1897–1908.
<https://doi.org/10.1007/s42770-020-00334-w>
- Bell, D. K., Wells, H. D., y Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., y Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4), 249-260.
- Blackman, C., y Subramaniam, R. (2023). A Bioinformatic Guide to Identify Protein Effectors from Phytopathogens. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2659, 95-101.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3159-1_8
- Bulgari, D., Alias, C., Peron, G., Ribaudó, G., Gianoncelli, A., Savino, S., . . . Gobbi, E. (2023). Solid-State Fermentation of *Trichoderma* spp.: A New Way to Valorize the Agricultural Digestate and Produce Value-Added Bioproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 71(9), 3994–4004. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07388>
- Carreras-Villaseñor, N., Sánchez-Arreguín, J. A., y Herrera-Estrella, A. H. (2012). *Trichoderma*: detección del entorno para la supervivencia y la dispersión. *Microbiología (Reading, Inglaterra)*, 158(1), 3-16. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052688-0>
- Castro-Gómez, R. D. (2015). *Bioproducto a base de una cepa nativa de Trichoderma harzianum Rifai para el manejo de la sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis Morelet) en bananeras orgánicas*. (Doctoral dissertation, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía).
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., y López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 149(3), 1579-1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., y Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere:

- interactions with plants . *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), fiw036.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>
- Corrales, V. A., y Chacha-Coyago, F. C. (2021). *Producción de bioetanol a partir de hidrólisis enzimática con trichoderma spp y posterior fermentación alcohólica con saccharomyces cerevisiae de cáscara de cacao* . (Doctoral dissertation, ESPOL. FCNM). .
- Cruz-Martínez, L. (2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo Trichoderma koningii Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto*. Pontificia Universidad Javeriana - Bogotá.
- Cui, Y., Li, J., Deng, D., Lu, H., Tian, Z., Liu, Z., y Ma, X. (2021). Solid-state fermentation by *Aspergillus niger* and *Trichoderma koningii* improves the quality of tea dregs for use as feed additives. *PLOS One*, 16(11), e0260045.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260045>
- El-Nahhal, Y., y El-Nahhal, I. (2021). Cardiotoxicity of some pesticides and their amelioration. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(33), 44726–44754.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-14999-9>
- Espinosa, L. C., Puente, G. C., y García, L. S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1-18.
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Galarza, L., Akagi, Y., Takao, K., Kim, C. S., Maekawa, N., Itai, A., y . . . Kodama, M. (2015). Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 81, 201-210. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0587-x>
- Gęsicka, A., Oleskiewicz-Popiel, P., y Łężyk, M. (2021). Recent trends in methane to bioproduct conversion by methanotrophs. *Biotechnology advances*, 53, 107861.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107861>

- Ghoreishi, G., Barrena, R., y Font, X. (2023). Using green waste as substrate to produce biostimulant and biopesticide products through solid-state fermentation. *Waste management (New York, N.Y.)*, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2023.01.026>
- González, T. C., González, Á., López, A. R., y González, B. D. (2020). Drying Habanero Pepper (*Capsicum chinense*) by Modified Freeze Drying Process. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(4), 437. <https://doi.org/10.3390/foods9040437>
- Guo, R., Li, G., Zhang, Z., y Peng, X. (2022). Structures and Biological Activities of Secondary Metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Marine Drugs*, 20(11), 701. <https://doi.org/10.3390/md20110701>
- Gupta, A., Singh, U. B., Sahu, P. K., Paul, S., Kumar, A., Malviya, D., . . . Saxena, A. K. (2022). Linking Soil Microbial Diversity to Modern Agriculture Practices: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), 3141. <https://doi.org/10.3390/ijerph19053141>
- Hernandez, M. L., Droby, S., Preciado, R. P., Rivas, G. T., González, E. R., Gutiérrez, M. P., y Ávila, Q. G. (2021). A Sustainable Alternative for Postharvest Disease Management and Phytopathogens Biocontrol in Fruit: Antagonistic Yeasts. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(12), 2641. <https://doi.org/10.3390/plants10122641>
- Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., y Alarcón, A. (2019). Trichoderma: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 98-112.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21.
- Islam, K., Rawoof, A., Ahmad, I., Dubey, M., Momo, J., y Ramchiary, N. (2021). *Capsicum chinense* MYB Transcription Factor Genes: Identification, Expression Analysis, and

- Their Conservation and Diversification With Other Solanaceae Genomes. *Frontiers in plant science*, 12, 721265. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721265>
- Jaroszuk-Ściśeł, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., . . . Janusz, G. (2019). Phytohormones (Auxin, Gibberellin) and ACC Deaminase In Vitro Synthesized by the Mycoparasitic Trichoderma DEMTkZ3A0 Strain and Changes in the Level of Auxin and Plant Resistance Markers in Wheat Seedlings Inoculated with this Strain Conidia. *International journal of molecular sciences*, 20(19), 4923. <https://doi.org/10.3390/ijms20194923>
- Kanakari, E., y Dendrinou-Samara, C. (2023). Fighting Phytopathogens with Engineered Inorganic-Based Nanoparticles. *Materials (Basel, Switzerland)*, 16(6), 2388. <https://doi.org/10.3390/ma16062388>
- Khalili, E., Sadravi, M., Naeimi, S., y Khosravi, V. (2012). Biological control of rice brown spot with native isolates of three Trichoderma species. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(1), 297-305. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120001000035>
- Kluts, I. N., Brinkman, M. L., de Jong, S. A., y Junginger, H. M. (2019). Biomass Resources: Agriculture. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 166, 13-26. https://doi.org/10.1007/10_2016_66
- Koul, B., Yakoob, M., y Shah, M. P. (2022). Agricultural waste management strategies for environmental sustainability. *Environmental Research*, 206, 112285. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112285>
- Larenas, C., Rivadeneira, L., Yáñez, P., y Balseca, D. (2015). Características morfológicas y de concentración de capsaicina en cinco especies nativas del género Capsicum cultivadas en Ecuador. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 22(2), 12-32.

- Lew, T. T., Sarojam, R., Jang, I. C., Park, B. S., Naqvi, N. I., Wong, M. H., . . . Strano, M. S. (2020). Species-independent analytical tools for next-generation agriculture. *Nature plants*, 6(12), 1408–1417. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00808-7>
- Li, Y., Peng, X., y Chen, H. (2013). Comparative characterization of proteins secreted by *Neurospora sitophila* in solid-state and submerged fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(4), 493-498. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.04.001>
- Loayza-Calva, K. N. (2020). *Determinación de las condiciones óptimas de fermentación para la obtención de bioetanol a partir del hidrolizado ácido de la corteza del cacao (Theobroma cacao) proveniente de la industria cacaotera del Ecuador*. Repositorio Institucional de la Universidad Politécnica Salesiana : <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18673>
- Ma, G. (2020). Bioproduct engineering: Channeling life science with industrial practice. *Engineering in life sciences*, 20(11), 440. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000074>
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., . . . Kazan, K. (2013). Fusarium pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67, 399–416. <https://doi.org/doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- Mac Loughlin, T. M., Peluso, M. L., y Marino, D. J. (2022). Multiple pesticides occurrence, fate, and environmental risk assessment in a small horticultural stream of Argentina. *The Science Of The Total Environment*, 802, 149893. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149893>
- Marx, I. J., van Wyk, N., Smit, S., Jacobson, D., Viljoen-Bloom, M., y Volschenk, H. (2013). Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 172. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-172>
- Matar, N., Macadré, C., Ammar, G. A., Peres, A., Collet, B., Boustany, N. E., . . . Ratet, P. (2022). Identification of beneficial Lebanese *Trichoderma* spp. wheat endophytes. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1017890. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1017890>

- McCarty, N. S., y Ledesma-Amaro, R. (2019). Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 37(2), 181–197.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.002>
- Migheli, Q., Balmas, V., Komoń-Zelazowska, M., Scherm, B., Fiori, S., Kopchinskiy, A. G., . . . Druzhinina, I. S. (2009). Soils of a Mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology*, 11(1), 35-46.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01736.x>
- Morales-Paredes, C. A., Rodríguez-Linzán, I., Saquete, M. D., Luque, R., Osman, S. M., Boluda-Botella, N., y Joan Manuel, R. D. (2023). Silica-derived materials from agro-industrial waste biomass: Characterization and comparative studies. *Environmental Research*, 231(1), 116002. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116002>
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., y Kenerley, C. M. (2011). Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective. *Microbiology*, 158(1), 35–45.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.053629-0>
- Naglot, A., Goswami, S., Rahman, I., Shrimali, D. D., Yadav, K. K., Gupta, V. K., . . . Veer, V. (2015). Antagonistic Potential of Native *Trichoderma viride* Strain against Potent Tea Fungal Pathogens in North East India. *The Plant Pathology Journal*, 31(3), 278-289.
<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2015.0004>
- Nanjundaswamy, A., y Okeke, B. C. (2020). Comprehensive Optimization of Culture Conditions for Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes of *Trichoderma* SG2 in Submerged and Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(1), 444-462.
<https://doi.org/10.1007/s12010-020-03258-1>
- Narwade, J. D., Odaneth, A. A., y Lele, S. S. (2023). Solid-state fermentation in an earthen vessel: *Trichoderma viride* spore-based biopesticide production using corn cobs. *Fungal Biology*, 127(7-8), 1146-1156. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.06.007>

- Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., . . . Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Frontiers in Plant Science*, 8, 102.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>
- Nogueira, K. M., de Paula, R. G., Antoniêto, A. C., Dos Reis, T. F., Carraro, C. B., Silva, A. C., . . . Silva, R. N. (2018). Characterization of a novel sugar transporter involved in sugarcane bagasse degradation in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for biofuels*, 11, 84. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1084-1>
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., y Soccol, V. T. (2000). Potencial biotecnológico de los residuos agroindustriales. I: bagazo de caña de azúcar. *Tecnología de Recursos Biológicos*, 74(1), 69-80.
- Park, H. S., Lee, J., Lee, S. C., Yang, T. J., y Yoon, J. B. (2016). The complete chloroplast genome sequence of *Capsicum chinense* Jacq. (Solanaceae). *Mitochondrial DNA. Part B, Resources*, 1(1), 164-165. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1144113>
- Pinta-García, A. (2020). *Evaluación de residuos vegetales para la multiplicación de Trichoderma spp.* Universidad Central del Ecuador:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/21502>
- Poalacin, J. M. (2015). *Estudio del adecuado crecimiento del hongo Trichoderma [Bachelor's thesis, Quito: UCE]*. Repositorio Digital Universidad Central del Ecuador:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4776>
- Pozo-Enríquez, A. E. (2020). *Trichoderma asperellum en el enriquecimiento protéico de residuos lignocelulósicos*. (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra): <http://190.15.137.77/handle/11010/581>

- Qin, L. Y., Jiang, N., Tang, M. Q., Miao, J. H., y Li, L. X. (2011). [Antagonism of *Trichoderma* spp. to fungi caused root rot of *Sophora tonkinensis*]. *Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials*, 34(4), 499–502.
- Racić, G., Vukelić, I., Kordić, B., Radić, D., Lazović, M., Nešić, L., y Panković, D. (2023). Screening of Native *Trichoderma* Species for Nickel and Copper Bioremediation Potential Determined by FTIR and XRF. *Microorganisms*, 11(3), 815.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11030815>
- Ranganathan, S., Dutta, S., Moses, J. A., y Anandharamakrishnan, C. (2020). Utilization of food waste streams for the production of biopolymers. *Heliyon*, 6(9), e04891.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04891>
- Reyes, A., Alejo, C., Ruíz, E., y Tun, J. (2012). Inhibición del crecimiento in vitro de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad*, 16(3), 161-165.
- Ries, L., Pullan, S. T., Delmas, S., Malla, S., Blythe, M. J., y Archer, D. B. (2013). Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with *Aspergillus niger*. *BMC Genomics*, 14, 541.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-541>
- Romero-Cortes, T., López-Pérez, P. A., Ramírez-Lepe, M., y Cuervo-Parra, J. A. (2016). Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 31(1), 32-45. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902016000100004>
- Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., y Casas-Flores, S. (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic

- acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 15-26. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9782-6>
- Sare, A. R., Jijakli, M. H., y Massart, S. (2021). Microbial ecology to support integrative efficacy improvement of biocontrol agents for postharvest diseases management. *Postharvest Biology and Technology*, 179, 111572. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111572>
- Shi, S., Tian, L., Xu, S., Ji, L., Nasir, F., Li, X., . . . Tian, C. (2019). The rhizomicrobiomes of wild and cultivated crops react differently to fungicides. *Archives of Microbiology*, 201(4), 477–486. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1586-z>
- Shoresh, M., Harman, G. E., y Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, 48, 21-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>
- Silva, R. N., Monteiro, V. N., Steindorff, A. S., Gomes, E. V., Noronha, E. F., y Ulhoa, C. J. (2019). Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. *Fungal biology*, 123(8), 565–583. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.06.010>
- Silvar, C., y García-González, C. A. (2017). Screening old peppers (*Capsicum* spp.) for disease resistance and pungency-related traits. *Scientia Horticulturae*, 218, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.02.037>
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., . . . Sharma, A. (2020). Trichoderma: The "Secrets" of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants*, 9(6), 762. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>
- Sosa, M. O., Pino, J. A., Ayora, T. G., Sauri, D. E., y Cuevas, G. L. (2017). Biological activities of volatile extracts from two varieties of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *International Journal of Food Properties*, 20((sup3)), S3042–S3051. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1397694>

- Steyaert, J. M., Weld, R. J., y Stewart, A. (2010). Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal Biology*, 114(2-3), 198-208. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2009.12.004>
- Stoelting, P., Knebel, C., y Braeuning, A. (2020). The Connection of Azole Fungicides with Xeno-Sensing Nuclear Receptors, Drug Metabolism and Hepatotoxicity. *Cells*, 9(5), 1192. <https://doi.org/10.3390/cells9051192>
- Torbati, M., Arzanlou, M., y da Silva Santos, A. C. (2021). Fungicolous *Fusarium* Species: Ecology, Diversity, Isolation, and Identification. *Current microbiology*, 78(8), 2850–2859. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02584-9>
- Troiano, D., Orsat, V., y Dumont, M. J. (2022). Solid-state co-culture fermentation of simulated food waste with filamentous fungi for production of bio-pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(11), 4029-4039. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11984-1>
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., y Lorito, M. (2010). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 341–354. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., y Jaroszek-Ścisła, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International journal of molecular sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Utrilla-Florez, G. (2021). *Trichoderma* como alternativa frente a los agroquímicos. *Universidad Científica*. <https://doi.org/10.21142/tb.2021.1873>
- Valiño, E. C., Elías, A., Torres, V., Carrasco, T., y Albelo, N. (2004). Mejoramiento de la composición del bagazo de caña de azúcar por la cepa *Trichoderma viride* M5-2 en un biorreactor de fermentación en estado sólido. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38(2), 145-153. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*.

- Vargas-Hoyos, H. A., y Gilchrist-Ramelli, E. (2015). Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Micología*(9-16), 42.
- Vico, S. (2017). *Factores abióticos que afectan la biosíntesis de ácido indolacético en bacterias endófitas de maíz*. [Tesis de licenciatura, Universidad de la República de Uruguay]. Repositorio Institucional Colibrí.: <https://hdl.handle.net/20.500.12008/19131>
- Volpi, M. P., Corzo, I. J., Bastos, R. G., y Santana, M. H. (2019). Production of humic acids by solid-state fermentation of *Trichoderma reesei* in raw oil palm empty fruit bunch fibers. *3 Biotech*, 9(11), 393. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1925-z>
- Wolińska, A., Górnica, D., Zielenkiewicz, U., Goryluk-Salmonowicz, A., Kuźniar, A., Stępniewska, Z., y Błaszczak, M. (2017). Microbial biodiversity in arable soils is affected by agricultural practices. *International Agrophysics*, 31(2), 259-271.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., . . . Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8(1), 71-126. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010071>
- Xie, P., Yang, S., Liu, X., Zhang, T., Zhao, X., Wen, T., . . . Yuan, J. (2023). Learning from Seed Microbes: *Trichoderma* Coating Intervenes in Rhizosphere Microbiome Assembly. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e0309722. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03097-22>
- Yu, Z., Wang, Z., Zhang, Y., Wang, Y., y Liu, Z. (2021). Biocontrol and growth-promoting effect of *Trichoderma asperellum* TaspHu1 isolate from *Juglans mandshurica* rhizosphere soil. *Microbiological Research*, 242, 126596. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126596>
- Zhang, C., Ali Khan, R. A., Wei, H., Wang, R., Hou, J., y Liu, T. (2022). Rapid and mass production of biopesticide *Trichoderma* Brev T069 from cassava peels using newly established solid-state fermentation bioreactor system. *Journal of environmental management*, 313, 114981. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114981>

Zin, N. A., y Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168–178.

<https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>