



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD Y VIABILIDAD DE
***Trichoderma harzianum* Rifai EN CINCO SUSTRATOS USADOS**
PARA LA ELABORACIÓN DE UN BIOFUNGICIDA EN
FORMULACIÓN LÍQUIDA”

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: VERÓNICA GEOCONDA GUILCAPI ÁVALOS
TUTORA: Dr. Cs. ROSA DEL PILAR CASTRO GÓMEZ

Riobamba-Ecuador

2016

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **“DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD Y VIABILIDAD DE *Trichoderma harzianum* Rifai EN CINCO SUSTRATOS USADOS PARA LA ELABORACIÓN DE UN BIOFUNGICIDA EN FORMULACIÓN LÍQUIDA”** es de responsabilidad de la señorita egresada Verónica Geoconda Guilcapi Ávalos, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dr. Cs. Rosa Castro G. DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN	_____	_____
Dra. Yolanda Díaz MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
Documentalista SISBIB-ESPOCH	_____	_____

Yo, Verónica Geoconda Guilcapi Ávalos, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originarios. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica contenidos en este trabajo de titulación.

Riobamba, 14 de abril de 2016

Verónica Geoconda Guilcapi Ávalos

Cédula de Identidad 060396876-9

Yo, Verónica Geoconda Guilcapi Ávalos, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

Verónica Geoconda Guilcapi Ávalos

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a Dios, ya que gracias a él he logrado concluir mi carrera.

A mis padres Raúl y Gloria, porque ellos estuvieron siempre a mi lado brindándome sus consejos y apoyo para ser de mí una gran persona.

A mi hijo Gabriel Sebastián, porque me mostró el lado dulce de la vida y fue el motor que impulsó a que alcanzara mi meta cuando casi parecía vencida.

A mis hermanos Héctor Geovanny y Sandra, porque aunque en la mayoría de las veces parece que estuviéramos en una batalla hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos.

Verónica

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por haberme permitido formarme en ella como persona y profesional.

A mis tutoras en este proyecto Dr. Cs. Rosa Castro y Dra. Marcia Pesántez por compartir sus conocimientos, esfuerzo, dedicación, paciencia y motivación ya que han sido fundamentales en mí formación académica. Con su calidez han sido capaces de ganarse mi admiración, así como también me siento en deuda con ellas por todo lo recibido durante este tiempo de trabajo.

A mis amigas Glenda, Karina, Lupita, Margarita y Valeria porque su presencia en mi vida es una gran fortuna.

Verónica

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	2
JUSTIFICACIÓN	3

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1 Estructura y Función del ADN.....	5
1.1.1 Extracción y purificación de ADN	5
1.2 Control biológico	6
1.2.1 Conservativo	6
1.2.2 Aumentativo.....	6
1.2.3 Clásico	6
1.3 Hongos antagonistas.....	7
1.3.1 Trichoderma sp.....	7
1.3.2 Trichoderma harzianum	9
1.3.2.1 Clasificación taxonómica.....	9
1.3.2.1 Ventajas de Trichoderma harzianum.....	10
1.3.2.2 Fisiología	11
1.3.2.3 Mecanismos de Acción.....	13
1.4 Sustratos en la producción de <i>Trichoderma sp.</i>	14
1.4.1 Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	14
1.4.2 Plátano (<i>Musa paradisiaca</i>).....	15
1.4.3 Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	15
1.4.3 Trigo (<i>Triticum vulgare</i>).....	16
1.4.5 Quinoa (<i>Chenopodium quinua</i>)	16
1.5 Bioformulado	17
1.5.1 Formulados Líquidos	17
1.6 Curva de crecimiento microbiano	18
1.6.1 Fase de latencia.....	18

1.6.2 Fase logarítmica	18
1.6.3 Fase estacionaria	19
1.6.4 Fase de muerte	19
1.7 Factores que influyen en el desarrollo fúngico	19
1.7.1 Temperatura	20
1.7.2 Humedad	20
1.7.3 pH	20
1.7.4 Radiación Solar	20
1.7.5 Materia Orgánica	21

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO	22
2.1 Lugar de Estudio	22
2.1.1 Datos Generales de Ubicación	22
2.2 Tipo y Diseño de Investigación	22
2.2.1 Por el tipo de investigación	22
2.2.2 Por la temporalidad	22
2.2.3 Por el tipo de enfoque	22
2.2.3 Por el diseño de investigación	23
2.3 Diseño Experimental.....	23
2.4 Unidad de análisis	23
2.5 Población de Estudio.....	23
2.6 Tamaño de Muestra.....	24
2.7 Selección de la Muestra	24
2.7. Material biológico	24
2.8 Técnicas de Recolección de Datos.....	24
2.8.1 Fases de laboratorio	24
2.9 Mecanismos	24
2.9.1 Aislamiento y Purificación de <i>Trichoderma harzianum</i>	24
2.9.2 Identificación molecular de <i>Trichoderma harzianum</i>	25
2.9.2.1 Extracción de ADN	25
2.9.2.3 Cuantificación ADN:.....	26
2.9.2.4 Amplificación marcadores ITS1/ITS4.....	26
2.9.2.5 Secuenciación:	26
2.9.3 Preparación del sustrato sólido	27

2.9.4	<i>Inoculación del microorganismo <i>Trichoderma harzianum</i></i>	27
2.9.5	<i>Preparación del bioformulado líquido</i>	28
2.9.6	<i>Cuantificación de esporas del bioformulado</i>	29
2.9.7	<i>Evaluación de la viabilidad</i>	30

CAPÍTULO III

3.1	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	31
3.2	Caracterización de la cepa de <i>Trichoderma harzianum</i>	31
3.2.1	<i>Características morfológicas</i>	31
3.2.2	<i>Características moleculares</i>	33
3.3	Preparación del bioformulado	36
3.4	Estabilidad del producto en 15 tratamientos	37
3.4.1	<i>Curvas de crecimiento para los tratamientos a 4°C</i>	37
3.4.2	<i>Curvas de crecimiento para los tratamientos a 18°C</i>	41
3.4.3	<i>Curvas de crecimiento para los tratamientos a 22°C</i>	45
3.5	Viabilidad del bioformulado	49
3.5.1	<i>Análisis de varianza del producto a 30 días</i>	49
3.5.2	<i>Análisis de varianza del producto a 45 días</i>	50
3.5.3	<i>Análisis de varianza del producto a 60 días</i>	52
3.6	Análisis Económico	53
	CONCLUSIONES	55
	RECOMENDACIONES	56
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

cm	Centímetros
°C	grados Celsius
G	gramos
Kg	Kilogramo
µm	micrómetros
µL	microlitros
mL	mililitros
L	litro
%	porcentaje
T	temperatura
g/mL	gramo por mililitro
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo
R	Repeticiones
PDA	Potato Dextrosa Agar
MIKROBEN	Microorganismos benéficos
DCA	Diseño Completo al Azar
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
pH	Potencial Hidrógeno
ITS	Internal transcribed spacer
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Polymerase Chain Reaction
mM	milimol
rpm	Revoluciones por minuto
δ	Densidad
CCCh-p1	Cepa de <i>Trichoderma harzianum</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2	Preparación de sustrato sólido.....	25
Figura 2-2	Bioformulado líquido.....	26
Figura 1-3	Cepa de <i>Trichoderma harzianum</i> en medio PDA.....	29
Figura 2-3	Identificación morfológica de <i>Trichoderma harzianum</i>	31
Figura 3-3	Micelio para extracción de ADN.....	31
Figura 4-3	Amplificación de los marcadores ITS1/ITS4.....	32
Figura 5-3	Secuenciación CCCh-p1.....	33
Figura 6-3	<i>Trichoderma harzianum</i> CCCh-p1.....	33

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en trigo a 4°C.....	32
Gráfico 2-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en cebada a 4°C.....	35
Gráfico 3-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en quínoa a 4°C.....	36
Gráfico 4-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en plátano a 4°C.....	36
Gráfico 5-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en arroz a 4°C.....	36
Gráfico 6-3	Curvas de crecimiento de los tratamientos a 4°C.....	37
Gráfico 7-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en trigo a 18°C.....	37
Gráfico 8-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en cebada a 18°C.....	39
Gráfico 9-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en quínoa a 18°C.....	39
Gráfico 10-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en plátano a 18°C.....	40
Gráfico 11-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en trigo a 4°C.....	41
Gráfico 12-3	Curvas de crecimiento de los tratamientos a 18°C.....	41
Gráfico 13-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en trigo a 22°C.....	42
Gráfico 14-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en cebada a 22°C.....	43
Gráfico 15-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en quínoa a 22°C.....	43
Gráfico 16-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en plátano a 22°C.....	44
Gráfico 17-3	Curva de crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en arroz a 22°C.....	45
Gráfico 18-3	Curvas de crecimiento de los tratamientos a 22°C.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2	Tratamientos a nivel de laboratorio para determinar la viabilidad y estabilidad.....	21
Tabla 2-2	Mix PCR para la amplificación de los marcadores ITS1/ITS4.....	24
Tabla 3-2	Programa de amplificación para los marcadores ITS1/ITS4.....	24
Tabla 1-3	Características de los conidios de <i>Trichoderma harzianum</i>	30
Tabla 2-3	Identificación molecular de <i>Trichoderma harzianum</i> por secuenciación.....	30
Tabla 3-3	Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad a los 30 días.....	45
Tabla 4-3	Prueba de Tukey al 5% para viabilidad a 30 días.....	46
Tabla 5-3	Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad a los 45 días.....	47
Tabla 6-3	Prueba de Tukey al 5% para viabilidad a 45 días.....	48
Tabla 7-3	Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad a los 60 días.....	49
Tabla 8-3	Prueba de Tukey al 5% para viabilidad a 60 días.....	51
Tabla 9-3	El análisis económico para cada tratamiento.....	51

RESUMEN

Se evaluó la estabilidad y viabilidad de un biofungicida preparado en formulación líquida con cinco sustratos a base de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum*, la cepa CCCh-p1, fue identificada en base a sus características morfológicas, culturales y moleculares, con el resultado obtenido se seleccionó la cepa de *Trichoderma harzianum* y se replicó en sustrato sólido (cascarilla de arroz + arroz partido), que fue utilizada para la preparación de las formulaciones con cinco sustratos los mismos que fueron almacenados a 4°C, 18°C y 22°C. Posteriormente se determinó la estabilidad del producto mediante la cuantificación de esporas con ayuda de la cámara de Neubauer durante 60 días. Se evaluó la viabilidad en el tiempo por el método de microcultivo y se realizó el análisis económico de los tratamientos. La cepa CCCh-p1 fue seleccionada para todos los procesos en esta investigación. Se comprobó que la estabilidad del producto influye con el tipo de sustrato usado en la formulación y la temperatura demostrando que el tratamiento más eficaz es el sustrato harina de trigo almacenado a 22°C con una concentración de esporas de $3,22 \times 10^9$ UFC/mL en la fase de latencia. En cuanto a la viabilidad de los tratamientos en relación al tiempo se obtuvo una eficacia del 88.47% en la formulación preparada con sustrato de plátano a 60 días de almacenamiento. El análisis económico demostró que no hay una variación significativa en los sustratos, por lo cual todos pueden ser utilizados para la producción de los bioformulados lo que es asequible al productor. Se recomienda la utilización de productos biológicos ya que contienen cepas nativas y están preparados a base de un sustrato que cuenta con el contenido proteico que requiere el hongo para su desarrollo.

Palabras clave: <BIOFUNGICIDA>, <CEPA CCCh-p1 [*Trichoderma harzianum*]>, <BIOFORMULADO>, <FORMULACIÓN LÍQUIDA>, <PORCENTAJE DE VIABILIDAD>, <CUANTIFICACIÓN CONIDIAL>, <MICROCULTIVO>, <MICROBIOLOGÍA>

SUMMARY

Stability and viability of a biofungicide prepared in liquid formulation with five substrates based on a native *Trichoderma harzianum* strain was evaluated, the CCCh-p1 strain was identified based on their morphological, cultural and molecular characteristics. With the obtained result the strain of *Trichoderma harzianum* was chosen and the solid substrate was replied (rice husks + broken rice) which was used for the preparation of formulations with five substrates the same were stored at 4°C, 18°C and 22°C. Subsequently, the stability of the product was determined through the spores quantification using a Neubauer chamber for 60 days. Viability was evaluated in time by micro-culture method and the economic analysis of the treatment was performed. The CCCh-p1 strain was selected for all these processes in this research. It was found that the product stability influences with the type of substrate used in formulation and temperature showing that the most effective treatment is the substrate of wheat flour stored at 22°C with a spore concentration of $3,22 \times 10^9$ CFU/mL (Colony forming unit per millimeter) in latency phase. Regarding to the feasibility of treatments about time, an efficiency of 88.47% in the formulation prepared with banana substrate for 60 days of storage was obtained. The economic analysis showed that there is no significant variation in the product price. That is why the price is affordable for the producer. The use of biological products are recommended because they contain native strains and are prepared from a substrate which have the protein content that requires the fungus for its development.

Keywords: <FUNGICIDE>, < STRAIN CCCh-p1 [*Trichoderma harzianum*]>, <BIOFORMULATED>, <LIQUID FORMULATION>, <PERCENTAGE OF FEASIBILITY>, <CONIDIAL QUANTIFICATION>, <MICRO-CULTURE>, <MICROBIOLOGY>

INTRODUCCIÓN

El entorno social ha intensificado una de las preocupaciones ambientales y agrícolas que por su interés en la obtención de productos alimenticios mal llamados de “calidad” para la sociedad, afectan los recursos naturales entre los más afectados agua y suelo; esta etapa que es una forma de vida empieza cuando la población agrícola hace de los productos alimenticios un negocio y deja de ser alimento generando la adquisición y uso de productos agroquímicos de manera descontrolada (García, 2012).

El sector productivo se ve obligado a buscar alternativas de cultivo para mejorar las cosechas de manera que permitan ingresar a mercados mayoristas nacionales porque los productores requieren mejorar su economía y principalmente están intimidados por la competencia dejando a un lado la importancia que produce el consumo de productos agrícolas tóxicos y que conlleva a severos daños a la salud. Otro de los daños que causa la utilización de pesticidas es la tolerancia y resistencia de las plagas frente a las plantas; lo que conlleva, a que los agricultores empleen desmesuradamente una variedad de plaguicidas ocasionando problemas a la salud humana y animales (García, 2012).

Los métodos de lucha o combate de hongos, se basan exclusivamente en la utilización de fungicidas convencionales, lo que ha acarreado efectos nocivos tales como la resistencia de los patógenos en los suelos y plantas, y disturbios biológicos en el ambiente. En la actualidad las investigaciones están dirigidas a la búsqueda de otras alternativas, entre ellas la utilización de organismos entomopatógenos para el control biológico de enfermedades en las plantas. Ante la urgencia de reemplazar a los agroquímicos con alternativas que recuperen, optimicen y conserven el equilibrio de los ecosistemas, numerosas investigaciones a nivel nacional e internacional confirman la efectividad del control biológico, particularmente en el aprovechamiento del antagonismo natural existente en los diferentes hongos habitantes de suelos mejorados o ricos en materia orgánica cuyos mecanismos de acción están basados en la producción de antibióticos y otras sustancias que inhiben su crecimiento (Pérez, 2011).

El manejo adecuado de bioformulados elaborados a base de organismos entomopatógenos proporciona grandes ventajas y beneficios para el control de enfermedades lo cual es una opción innovadora para minimizar el consumo de plaguicidas y recuperar la microflora del suelo que es la parte viva del suelo responsable por la dinámica de transformación y desarrollo (Pérez, 2011).

Entre los hongos saprófitos utilizados para el control biológico sobresalen algunas especies de *Trichoderma sp.*, cuyas propiedades entomopatógenas son conocidas en el campo de la

fitopatología y que continuará siendo objeto de estudio hasta lograr desarrollar esta técnica a nivel comercial; ya que, las posibilidades de control biológico son alentadoras, al contribuir con la desintoxicación química del hombre y del suelo (Pérez., 2011).

A pesar de las numerosas investigaciones, sobre el tema pocos métodos de control biológico han llegado a comercializarse. Para que un producto sea distribuido debe existir demanda por los productores y otra parte interesada en las cadenas de distribución comercial, ser técnica y económicamente asequibles y atractivos competitivamente en relación con otros controles; ser tolerables con los grupos ecologistas y los responsables de hacer cumplir las normativas legales ambientales vigentes; y demostrar eficacia ante otros tipos de controles fitopatológicos confiables en cuanto a los rendimientos; así como, persistentes en su actividad (Vásquez, 2011).

ANTECEDENTES

Una de las aplicaciones agroindustriales que ha despertado interés en la comunidad agrícola es la utilización de bioformulados líquidos o bioplaguicidas, la necesidad de desarrollar más a fondo la preparación de bioformulados a base de hongos y determinar la adaptación de microorganismos biocontroladores de plagas y enfermedades en diferentes sustratos que están asequibles en el mercado local a bajo costo, con el fin de ofertar al agricultor productos estables y eficaces que preserven los suelos agrícolas y el medio ambiente (Vásquez, 2011).

Los bioformulados tienen como base activa un microorganismo benéfico que ayuda al desarrollo fitohormonal y atenúa las enfermedades, permite que el crecimiento de sus raíces sea más fuerte y por lo tanto, incrementa los sistemas radiculares más haciéndolos más sanos porque actúan en el parasitismo directo, ocasionando que el micelio de *Trichoderma sp.* se implante en el hongo hospedero y actúe el micoparasitismo de manera natural estas técnicas de biocontrol de plagas las aplican varios países latinoamericanos entre ellos Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú (Vásquez, 2011).

Ante esta problemática ambiental, el sector productivo considera que la agricultura orgánica es una alternativa sostenible de mayor impacto en el ambiente ante un biocontrol de plagas, y la eficacia del producto se mide a través de laboratorio mediante la viabilidad y estabilidad de los hongos entomopatógenos de los formulados líquidos cuya base tiene el ingrediente activo o la proteína adecuada para el desarrollo microbiano y el tiempo de vida útil del producto (Vásquez, 2011).

JUSTIFICACIÓN

La metodología que nos permite cumplir con los objetivos de la Investigación experimental obedece a un Diseño Completo al Azar (DCA), Investigación que se realizará en el Laboratorio de Fitopatología en la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH, y cuyos resultados serán utilizados en el mejoramiento de la producción de biopesticidas que lleva a cabo la Unidad de Producción “MIKROBEN” (Microorganismos Benéficos), la cual comercializa productos biológicos desde el año 2000 que pone a disposición del productor agrícola ecuatoriano, bioformulados para el control biológico de plagas y enfermedades en los cultivos agrícolas tendiendo así a disminuir el uso de agroquímicos altamente tóxicos, que deterioran la salud y el ambiente.

La presente investigación propuso dar solución a la problemática del uso indiscriminado de agroquímicos y dar realce a medidas más amigables con el ambiente como es el uso de controladores biológicos. El uso de residuos de agroindustria permiten obtener productos a bajo costo y estables con un tiempo prolongado de vida útil asequible al bolsillo del productor agrícola, usando cepas de microorganismos nativos no modificados genéticamente objetivos que se encuentran establecidos dentro de la política del buen vivir. Los productores utilizan *Trichoderma harzianum*, para el control fitopatológico porque actúan como biofungicidas por su fácil desarrollo, obtención, cultivo, aislamiento y fácil aclimatación a los sustratos. Las especies de *Trichoderma sp* no agreden a plantas superiores actuando de forma natural el proceso de micosis (Infante, 2011).

MIKROBEN (Microorganismos Benéficos) interesado en desarrollar proyectos de investigación enmarcados en los requerimientos de Cambios de la Matriz Productiva del país, ha comprometido el apoyo y financiamiento para el desarrollo de esta investigación.

El interés del mercado local por limitar el uso de agroquímicos ha llevado a la búsqueda de alternativas amigables con el ambiente como es el uso de bioformulados líquidos elaborados a base de un sustrato donde los hongos entomopatógenos realizan sus funciones vitales en condiciones óptimas de temperatura, lo cual demuestra ser eficiente para prolongar la calidad de vida útil del producto con *Trichoderma sp*. y brindar al sector productivo facilidades para adquirir una serie de productos en diferentes presentaciones; siendo así, la formulación líquida más comercial por su fácil preparación y que además contiene el sustrato con el material proteico que requiere el microorganismo para desarrollarse (Infante, 2011).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la estabilidad y viabilidad de *Trichoderma harzianum* Rifai en cinco sustratos usados para la elaboración de un biofungicida en formulación líquida.

Objetivos Específicos

- Caracterizar la cepa de *Trichoderma harzianum* Rifai del Banco de Cepas del Departamento de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales ESPOCH.
- Preparar el biofungicida en formulación líquida a base de *Trichoderma harzianum* con cada uno de los cinco sustratos.
- Determinar la estabilidad del biofungicida en formulación líquida a base de *Trichoderma harzianum* Rifai hasta los 60 días.
- Determinar el porcentaje de viabilidad del biofungicida a base de *Trichoderma harzianum*.
- Analizar económicamente los tratamientos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Estructura y Función del ADN

Esta era se abrió con el descubrimiento de un nuevo compuesto fosfórico orgánico, en las células ricas en materia nuclear. Llamado primeramente nucleína y luego cromatina, se demostró luego que este compuesto constaba de ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteína. A este le siguieron otros descubrimiento el análisis de ADN mostró que contenía cuatro clases de unidades estructurales, llamadas nucleótidos, el ADN se distingue del ARN (Ácido Ribonucleico) por tener un azúcar diferente, la desoxirribosa, en lugar de la ribosa, y una base distintiva, la timina, en vez de uracilo (Fruton, 2011, pp. 2-5).

1.1.1 *Extracción y purificación de ADN*

En la actualidad el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos (Schlötterer, 2014, pp. 63-69).

Estos marcadores se obtienen con técnicas como la PCR (Polymerase Chain Reaction) y secuenciación que hacen posible analizar la variación en la molécula del ADN con un detalle sin precedentes. Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución, el comportamiento, la selección natural, las interacciones biológicas, la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas, las relaciones filogenéticas, entre otros. La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende en gran medida de la extracción de ADN íntegro y puro (Hudson, 2010, p 20).

Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula, pero en presencia de etanol se rompe la capa hidratante y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como Na⁺ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN precipite. Por otro

lado, la carga neta negativa del ADN le permite unirse a moléculas y matrices inorgánicas cargadas positivamente (Nasón, 2011, pp. 12-15).

1.2 Control biológico

El control biológico hace referencia al control que se realiza de forma natural, el mismo que se encarga de regular la cantidad de animales y plantas a través de antagonistas naturales como patógenos, parásitos y predadores o también se refiere al control de las plagas, en el cual el ser humano manipula los agentes naturales con la finalidad de evitar en actividades relacionadas con la agricultura, forestación y en el comercio de productos agrícolas. Cuando se realiza un control biológico se lo puede hacer de tres formas las mismas que pueden ser combinadas o independientes (Andrade, 2012, p. 3).

1.2.1 Conservativo

Control que se fundamenta en modificar las prácticas de cultivos ancestrales con la finalidad de mejorar el aumento de los agentes de control biológico naturales y sus reacciones que en el suelo se producen (Andrade, 2012, p. 3).

1.2.2 Aumentativo

Aquí los diferentes agentes que son empleados para realizar el control biológico son producidos en grandes cantidades en los laboratorios y son aplicados en forma inoculante para la destrucción de las plagas (Andrade, 2012, p. 3).

1.2.3 Clásico

Es la etapa aplicativa que esta combinada por el descubrimiento, importación y establecimiento de antagonista naturales extraños. El control biológico es confiable y no presenta reacciones negativas sobre el ecosistema natural puesto que está libre de efectos complementarios relativos a los tóxicos de amplia dispersión, el control biológico en uno de los mejores métodos de relación entre costos y efectividad cuando se aplica de forma profesional (Andrade, 2012, p. 3).

1.3 Hongos antagonistas

La forma de vida entre los microorganismos en la naturaleza no se desarrolla de forma aislada unos de otros, sino que al contrario se relacionan de forma simbiótica o antagonista. Desde los primeros trabajos realizados por Wending en el año de 1932, el agente de biocontrol realizado en base al hongo *Trichoderma sp.* ha sido el más estudiado (Endara, 2012, p. 17).

1.3.1 *Trichoderma sp.*

Este género puede encontrarse en ambientes aerobios y de forma especial en los suelos que tienen un pH entre neutro y ácido con un alto contenido de materia orgánica, que por tener una relación estrecha en el desarrollo de este género se ha realizado una subclasificación en hongos depredadores hipogeos y lignolícolas. Este género es empleado en varias actividades comerciales para la producción de enzimas y para el control de patógenos que causan enfermedades en la plantas (Endara, 2012, p. 18).

Este es un hongo que crece muy rápido en el suelo, es un saprofito de la madera y del suelo. Está constituido por estructuras del tipo de conidias hialinas uniceluladas, presenta una forma ovoide en conidióforo hialino largo no verticilado. Tiene la propiedad de producir estructuras muy importantes como clamidosporas las mismas que le permiten mantener la existencia de este género en condiciones muy desfavorables que se presentan en el suelo, además tienen la capacidad de reproducirse en centros pequeños (Endara, 2012, p. 18).

El porcentaje de humedad presente en el suelo suministrada por la precipitación o por el riego, permite mejorar notablemente las condiciones de crecimiento de varios microorganismos presentes en el mismo, entre ellos se tiene que el *Trichoderma* aprovecha de esta humedad para pasa de un estado de latencia a uno muy activo, desarrollándose adecuadamente en un porcentaje de humedad del 60 % de la capacidad de saturación del suelo (Endara, 2012, p. 19).

Cuando el porcentaje de humedad es muy elevado conlleva a que disminuya el porcentaje de oxígeno por la saturación de los espacios entre las partículas del medio donde se desarrollan lo cual hace que la población de hongos disminuya y ponga en peligro la supervivencia de este género. Su población se ve beneficiada por otro parámetro como el pH ácido el cual permite que su población aumente debido a la formación de una gran cantidad de conidióforos, germinación de conidias y por una competencia limitada con otros organismos como actinomicetos y algunas bacterias que se ven afectados por el pH ácido del medio. La temperatura es otro factor que limita su desarrollo puesto que valores entre 10 °C y 15 °C que presenta un suelo y además que contenga

un bajo nivel de nutriente este hongo no crece y su actividad benéfica se ve afectada (Endara, 2012, p. 19).

La forma que este hongo actúa está relacionado a la degradación de la materia orgánica que está presente en el suelo y por la relación antagonista con otros organismos patógenos de las plantas que para su control utiliza procesos como el amensalismo, depredación, parasitismo, competición e hiperparasitismo. El género *Trichoderma* interviene en la transformación de varias proteínas presentes en el medio, en la degradación de la lignina y el humus, que por estar formadas por estructuras con núcleos aromáticos que son degradados por reacciones de oxidación de sus cadenas laterales. Además participa en la transformación de moléculas como la celulosa (polímeros de glucosa con un elevado peso molecular), en la biotransformación de la hemicelulosa (polisacárido que por el proceso de hidrólisis libera hexosa y pentosa), en el proceso de la mineralización del nitrógeno (reacciones hidrolíticas). El crecimiento de la planta, vigor germinativo de las semillas, mejor crecimiento de las raíces y una expresión fenotípica muy buena es el resultado de los procesos biológicos de digestión que realiza este hongo (Endara, 2012, p. 19).

Varias especies de *Trichoderma* han desarrollado la propiedad antagonista contra algunos hongos fitopatógenos entre estos tenemos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* fs *dianthii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotricum gloesporioides*, *Sclerotium rolfsii*, *Rosellinia bunodes*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora Cactorum* con *Trichoderma harzianum*, *Botrytis cinerea* con *T. virens*, *Rosellinia bunodes* con *T. pseudokoningii*, *Armillaria mellea* con *T. viride*, *Phytium sp.* y *Phytophthora sp.* con *T. hamatum*, *Cryptonectria parasítica* con *T. parceromosum* (Endara, 2012, p. 20).

La dosis eficiente de *Trichoderma* que se ha establecido como biorregulador de muchos microorganismos fitopatógenos que se desarrollan en el suelo es de 1×10^6 UFC para una área de 1 m^2 dicho valor se ha establecido en varios estudios realizados en el laboratorio los mismos que fueron comprobados mediante pruebas de eficacia en diversos cultivos agrícolas (Endara, 2012, p. 20).

Se ha demostrado que mediante la aplicación de *Trichoderma harzianum* en el suelo durante la resiembra, siembra y post-emergencia prematura se puede controlar las enfermedades en valores superiores al 60 % en los cultivos, como también permite controlar la aparición temprana de los síntomas de las enfermedades en las plantas. Las pruebas realizadas en el campo han demostrado un crecimiento en la actividad de la especie de *Trichoderma harzianum* como un micoparásito, cuando esta se inocula en las semillas, lo que permite reducir la población de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium sp.* y *Phytium sp.* en el suelo (Endara, 2012, p. 20).

Para obtener los resultados esperados cuando en el campo se aplica *Trichoderma* es importante tomar en cuenta muchos parámetros que intervienen en la correcta manifestación del microorganismo que están estrechamente relacionados con interacción planta hospedante-fitopatógeno susceptible-ambiente favorable (temperatura del suelo, porcentaje de humedad y oxígeno, pH), condiciones del suelo (estructura, contenido de materia orgánica y nutrientes) y tiempo (Endara, 2012, pp. 20-21).

1.3.2 *Trichoderma harzianum*

Esta especie es un hongo micro-parasito que en dependencia de las condiciones del lugar en el cual, este se reproduce sus hifas crecen y se ramifican hasta alcanzar tamaños entre 3 y 12 μm de diámetro. Su esporulación asexual tiene un color verde y sucede en conidios unicelulares que comúnmente presentan un diámetro que va de 3 a 6 μm (Andrade, 2012, p. 10).

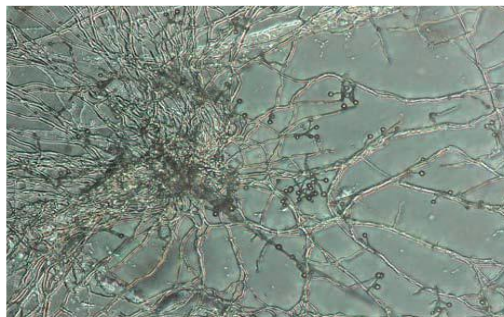


Figura1-1: *Trichoderma harzianum*

Fuente: (Endara, 2012, p. 21)

1.3.2.1 Clasificación taxonómica

Según Agrios (2005), se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

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

Esta especie de hongo inhibe varios microorganismos parásitos que están presentes en el suelo, entre estos se tiene algunos géneros como *Armillaria*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium* y

Rhizoctonia que causan enfermedades tanto temporales como perennes. El hongo *Trichoderma harzianum* también actúa contra enfermedades causados en los vegetales por organismos del género *Botrytis* o *Stereum*. Sobre esta especie se ha logrado estudiar cuatro formas de acción antibiosis, estimulación de defensa de la planta, competencia por nutrientes y el micoparasitismo (Andrade, 2012, pp. 10-11).

Este hongo se logra encontrar en la mayor parte de los suelos y actúa como antagonista de varios patógenos vegetales. El crecimiento rápido de sus colonias son beneficiadas por plantas cuyas raíces les brindan las condiciones adecuadas para su desarrollo, algunas raíces brindan estas propiedades mientras estas están en crecimiento. Se puede aplicar de forma directa con gran facilidad mediante cualquier técnica convencional sobre semillas, suelo, trasplantes, semilleros, macetas y bandejas una vez que se haya bioformulado el producto. Cuando el hongo es aplicado en las raíces de las plantas su mecanismo de acción es formar una película protectora, la misma que permite realizar una simbiosis, en la que las raíces son protegidas por el hongo y este se nutre de los exudados que las raíces segregan, a la misma vez esta simbiosis se realiza se reduce las fuentes de alimento de los organismos patógenos. La capa protectora que el hongo forma es empleada como una barrera que limita la entrada de los microorganismos patógenos en las raíces de las plantas. La acción que se desarrolla aquí es de hiperparasitismo en la que un organismo parasita a otro organismo de igual naturaleza, en el que lo utiliza para alimentarse y de esta forma los destruye, es decir compete por los nutrientes y el espacio con otros hongos que son patógenos (Andrade, 2012, p. 11).

1.3.2.1 Ventajas de *Trichoderma harzianum*

- Brinda protección a las raíces de varias enfermedades ocasionados principalmente por patógenos como *Fusarium*, *Pythium* y *Rhizoctonia* lo cual facilita para que las raíces carezcan más fuertes y presenten un sistema radicular totalmente sano.
- Incrementa la capacidad para absorber el agua y los nutrientes, además permite mejorar las condiciones del estrés hídrico.
- Para ser aplicado no es necesario de equipos especiales.
- Tiene la propiedad de ser compatible con inoculantes que se aplican en leguminosas y presenta la posibilidad de ser aplicado para semillas que has sido tratado con fungicidas químicos.
- Permite reducir costos puesto que reduce el uso de fungicidas y fertilizantes químicos lo cual contribuye a que las plantas tengan más raíces y las utilicen de mejor manera (Andrade, 2012, p. 11-12).

1.3.2.2 Fisiología

Este hongo está presente en varios componentes orgánicos y en los suelos, tienen la capacidad de adaptarse a las variaciones ambientales que les permiten una distribución muy extensa. Varias de las especies se adaptan fácilmente en zonas templadas y secas en tanto que otras lo hacen en zonas templadas y frías. Por su producción de toxinas y antibióticos estos hongos son muy reconocidos. En el cultivo de hongos comestibles se han descubierto varias especies y cepas de *Trichoderma harzianum* (Rifai), en la que muchos de ellos son beneficiosos y otros son dañinos, es por ello que su interacción antagonista entre los hongos que se han cultivado aun no es conocida en su totalidad es por cuanto que hay mucha diferencia entre las cepas y especies (Romero *et al.*, 2009, p. 146).

El hongo *T. harzianum* Rifai, cuando está en su fase inicial el color que presenta sus micelios es de color blanco y conforme avanza su desarrollo cada vez el micelio toma un color verde oscuro posteriormente a la esporulación. Las colonias de esta especie por lo general crecen en un medio con un pH ácido entre valores de 4,5 y 5, se desarrollan y alcanzan su madurez de forma muy rápida es por cuanto que a los cinco días después de ser encubados en un medio de cultivo de agar de dextrosa y papa (PDA) y con una temperatura de 25 °C ya están formadas sus colonias, otro parámetro muy importante para su desarrollo es la humedad puesto que prefieren un elevado porcentaje de humedad y alta concentración de bióxido de carbono en su entorno atmosférico (Romero *et al.*, 2009, p. 146).

Los hongos tienen la propiedad de adaptarse y desarrollarse en diferentes medios debido a que múltiples agentes de tipo genético asexuales como la recombinación parasexual, la mutación y otras transformaciones intervienen en la modificación entre los núcleos de un mismo microorganismo (Romero *et al.*, 2009, p. 147).

En *T. harzianum* Rifai, su periodo de vida empieza cuando el microorganismo crece y forma varias ramificaciones como una hifa común que alcanza un tamaño entre 5 y 10 μm de diámetro. Cuando las esporas del hongo hayan alcanzado un tamaño entre 3 y 5 μm de diámetro se produce la esporulación asexual las mismas que son liberadas en grandes cantidades, además de producirse la esporulación se forman clamidosporas que están dispuestas de forma intercalada individualmente, aunque en algunas ocasiones dos o más de estas clamidosporas se pueden unir. En estudios realizados anteriormente sobre el género *T. harzianum* (Rifai), se han logrado distinguir cuatro biotipos que son Th1, Th2, Th3 y Th4, estos biotipos que se lograron diferenciar se los realizó en base al porcentaje de crecimiento que sus micelios alcanzaron, el aspecto que presenta la colonia formada y a nivel microscópico las características morfológicas, que incluyen

las fiálides y fialósporas, estos biotipos tiene la capacidad de dañar los cultivos de los hongos comestibles (Romero *et. al.*, 2009, p. 147).

Dentro del grupo de biotipos diferenciados los Th2 y Th4 son los que más inciden en el cultivo de hongos comestibles y los que más actúan como virus que perjudican estos cultivos, por otro lado los biotipos Th1 y Th3 tiene la capacidad de infectar la composta del hongo pero en pocas ocasiones estos causan perdidas en los cultivos de hongos comestibles (Romero *et. al.*, 2009, p. 147).

La estructura que forma la ramificación de esta especie es en forma de pirámide, el tamaño que alcanzan sus conidióforos oscila entre $62,5$ a 69×3 a $4,7 \mu\text{m}$, estas estructuras microscópicas presentan un color verde, con varias ramificaciones dispuestas perpendicularmente y en algunas ocasiones se pueden observar la formación de ramificaciones laterales que forman grupos de dos o tres que están dispuestas en un ángulo muy amplio características que observan en la figura 2-1.

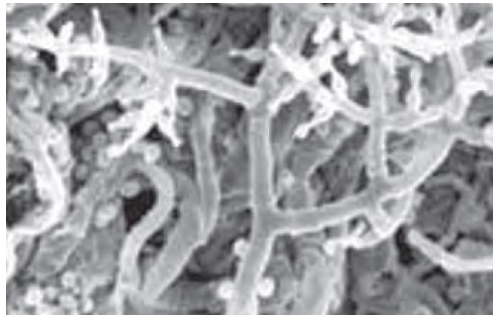


Figura2-1: Conidióforos de forma piramidal
Fuente: (Romero *et. al.*, 2009, p. 148)

Estructuras como las fiálides son largas y muy delgadas, se encuentran distribuidas de forma independientes a lo largo de su eje, son asimetrías con tamaños variados que van desde los $6,3$ a $15,6 \times 2,7$ a $3,4 \mu\text{m}$ que presentan una forma citriforme y subglobosos. Las clamidosporas están dispuestas en forma intercalada y que están formadas por el micelio sumergido, subglobosas, con pared dentada, de color verde suave y un tamaño de 10 a $12,5 \mu\text{m}$ (Romero *et. al.*, 2009, p. 147).

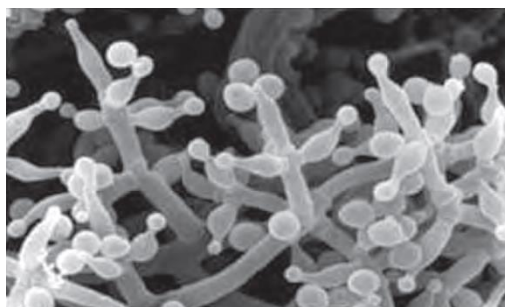


Figura3-1: Conidióforos de forma piramidal
Fuente: (Romero *et. al.*, 2009, p. 148)

1.3.2.3 Mecanismos de Acción

En la acción biocontroladora de *Trichoderma* los principales son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno. Estos mecanismos se ven favorecidos por la habilidad de los aislamientos de *Trichoderma* para colonizar la rizósfera de las plantas. Otros autores han sugerido distintos mecanismos responsables de su actividad biocontroladora, que incluyen, además de los mencionados, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Lorenzo, 2001, pp. 16-18)

Competencia

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, y pectinas, entre otros) y microelementos. Esta forma de competencia en los suelos o sustratos ricos en nutrientes no tiene importancia desde el punto de vista práctico. Por ello, cuando se emplea fertilización completa o existe exceso de algunos de los componentes de los fertilizantes e inclusive en suelos con alto contenido de materia orgánica, este tipo de antagonismo es poco eficaz.

La competencia por sustrato o espacio depende de si el mismo está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una micobiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato (Lorenzo, 2012, pp. 10-19).

Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados. Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno (Lorenzo, 2012, pp. 23-24).

Antibiosis

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

Actividad lítica

En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista. Por los puntos de contacto donde se produce la lisis y aparecen los orificios, penetra la hifa del micoparásito en las del hongo hospedante. La actividad enzimática en *Trichoderma* ha sido estudiada extensamente, así como las posibles funciones que desenvuelven en el micoparasitismo (Lorenzo, 2012, p. 28).

1.4 Sustratos en la producción de *Trichoderma sp.*

De forma muy común para la producción de este género se emplean como materia prima materias o compuestos que se derivan de la agricultura, subproductos que se derivan de las agroindustrias, pero de forma general se prefiere residuos de composición orgánica puesto que estos remplazan la necesidad de nutrientes que necesitan los microorganismos y son obtenidos por un costo muy económico (Poalacín, 2015, p. 12).

Para la producción de microorganismos y que estos a su vez puedan realizar de forma adecuada la síntesis celular y producir metabolitos cuando estos lo necesiten, los sustratos empleados deben tener en lo posible todos los nutrientes necesarios. En el cultivo de *Trichoderma* cuando se producen esporas el elemento que en más cantidad se encuentra es el carbono, en tanto que el porcentaje de nitrógeno se convierte en un factor que limita el crecimiento de los microorganismos. Como en muchos procesos la relación carbono nitrógeno es fundamental, en la producción de *Trichoderma* también es muy importante puesto que de esto depende que se formen sus esporas (Poalacín, 2015, p. 12).

1.4.1 Arroz (*Oryza sativa*)

La estructura química que este cereal presenta es parcialmente muy simple en comparación con otros sustratos empleados para en la producción de hongos, además posee un elevado porcentaje

de almidón. El almidón principalmente está constituido por dos polímeros que están muy relacionados entre sí pero en proporciones diferentes, la amilosa se encuentra en proporciones que varían en un rango de entre 16 a 30 % y la amilopectina entre 68 a 85 %. La amilosa es un polímero de glucosa que está unido por enlaces α -1,4 glucosídicos dispuestos especialmente en cadenas lineales. Por otro lado la amilopectina es un polímero de glucosa con cadenas muy ramificadas que también tiene enlaces α -1,6 glucosídicos en las uniones de cada ramificación. Debido a como estas estructuras están formadas permiten que el hongo *Trichoderma* puede hidrolizar el polímero de almidón a través de enzimas como glucoamilasas, α -amilasa y β -amilasas lo que permite la producción de esporas y el crecimiento de los micelios (Poalacín, 2015, p. 13).

1.4.2 Plátano (*Musa paradisiaca*)

Los bananos son el cuarto producto agrícola más importante en el mundo, después del arroz, trigo y maíz en términos de producción. Son una fuente barata y de fácil producción de energía, así como de vitaminas A, C y B6. La harina de Plátano es un producto 100% natural, elaborado a base de plátano orgánico. Es un polvo de color blanco parduzco, de fácil digestión y susceptible a la humedad. Tiene fácil cocción. La Harina de Plátano es uno de los alimentos más equilibrados ya que contiene todos los grupos de vitaminas y nutrientes. Es muy rica en Carbohidratos y sales minerales, como: calcio orgánico, potasio, fósforo, hierro, cobre, flúor, yodo y magnesio. La harina de banano es muy rica en hidratos de carbono y sales minerales como: calcio orgánico, potasio, fósforo, hierro, cobre, flúor, iodo y magnesio. También posee vitaminas del complejo B, como la tiamina, riboflavina, pirodoxina y ciancobalamina, es por lo cual que constituye una de las mejores maneras de nutrir de energía vegetal nuestro organismo. El contenido nutricional de harina de plátano refleja una elevada cantidad de carbohidratos totales de 81.03%, una importante cantidad de proteínas del 2-3%, y un contenido de almidón del 73%, es una fuente de almidón resistente (Goñi, 2011, pp.445-446).

1.4.3 Cebada (*Hordeum vulgare*)

Las propiedades nutricionales de la Cebada son altamente beneficiosas para la salud y debería incluirse en toda dieta equilibrada y saludable. Ya hace miles de años la cebada se consumía y aprovechaban así todo su potencial, de hecho fue uno de los primeros cereales cultivados y con el que se empezó a elaborar cerveza, la cebada contiene gluten (aunque en poca cantidad) el valor nutricional, la cebada es rica en azúcares o en hidratos de carbono complejos, principalmente almidón y celulosa y cantidades menores de maltosa y rafinosa. En proporciones menores, contienen también hidratos de carbono simples como fructosa y glucosa y otros azúcares además

rica en minerales especialmente en calcio y potasio, magnesio, fósforo y hierro todo ello contiene un poder remineralizante muy elevado (Goñi, 2011 pp.435-437).

1.4.3 Trigo (*Triticum vulgare*)

La harina de trigo es el producto que se obtiene de la molienda y tamizado del endospermo del grano de trigo hasta un grado de extracción determinado, considerando al restante como un subproducto (residuos de endospermo, germen y salvado), la harina de trigo posee constituyentes aptos para la formación de masas (proteína – gluten), pues la harina y agua mezclados en determinadas proporciones, producen una masa consistente, tenaz, con ligazón entre sí, que al ser extendida ofrece una determinada resistencia, a la que puede darse la forma deseada, y que resiste la presión de los gases producidos por la fermentación.

El gluten se forma por hidratación e hinchamiento de proteínas de la harina: gliadina y glutenina (Álvarez *et al.*, 2009).

1.4.5 Quinua (*Chenopodium quinua*)

El consumo de quinua es cada vez más popular entre las personas interesadas en la mejora y el mantenimiento de su estado de salud mediante el cambio de los hábitos alimenticios, ya que es un excelente ejemplo de “alimento funcional” (que contribuye a reducir el riesgo de varias enfermedades y/o ejerciendo promoción de la salud). Este alimento, por sus características nutricionales superiores, puede ser muy útil en las etapas de desarrollo y crecimiento del organismo. Además, es fácil de digerir, no contiene colesterol y se presta para la preparación de dietas completas y balanceadas.

La quinua también puede ser utilizada tanto en las dietas comunes como en la alimentación vegetariana, así como para dietas especiales de determinados consumidores como adultos mayores, niños, deportistas de alto rendimiento, diabéticos, celíacos y personas intolerantes a la lactosa (Llerena, 2015).

Lo que caracteriza a la quinua es su valor proteico elevado, donde la calidad de sus proteínas y balance son superiores en ésta que en los demás cereales, fluctuando entre 12.5 a 16.7%. El 37% de las proteínas que posee la quinua está formado por aminoácidos esenciales.

Los aminoácidos esenciales son aquellos que no los produce el organismo, por lo que necesitan ser ingeridos a través de la dieta; la carencia de estos aminoácidos en la dieta limita el desarrollo del organismo, ya que no es posible reponer las células de los tejidos que mueren o crear nuevos tejidos, en el caso del crecimiento. Para el ser humano, los aminoácidos esenciales son: Valina,

Leucina, Treonina, Lisina, Triptófano, Histidina, Fenilalanina, Isoleucina, Arginina y Metionina (Llerena, 2015).

1.5 Bioformulado

La producción y formulación de agentes de biocontrol son términos estrechamente ligados al concepto de microbiología industrial, cuyo objetivo es usar microorganismos en procesos de propagación artesanal, semi-industrial e industrial, para obtener productos comerciales aplicables al campo (Aimacaña, 2007, pp.37-38).

1.5.1 Formulados Líquidos

Sustancia que se la obtiene artesanalmente con una base de sustrato y que contienen la proteína adecuada y el ingrediente activo efectivo para mantener la estabilidad, viabilidad y actividad de los conidios de los microorganismos que se hayan escogido para la supervivencia en este medio. Una buena formulación es la base para el éxito de un bioplaguicida de origen microbiano; la posibilidad de obtener productos adecuados depende de las propias características del microorganismo y su relación con los componentes de la formulación (excipientes) y el ambiente de almacenamiento (Tanzini, 2011, pp.15-18).

Para el desarrollo de nuevos productos de origen biológico se deben tener en cuenta diferentes aspectos: primeramente definir un medio de cultivo óptimo y el mejor sistema para la obtención masiva de inóculo que permita una buena relación costo - rendimiento en la producción; establecer ensayos de producción a pequeña escala; garantizar la estabilidad del producto y determinar las condiciones de almacenamiento; poder utilizar la maquinaria *standard* de cualquier explotación agrícola para su aplicación, y ser efectivo a unas dosis parecidas a las utilizadas para los agroquímicos así como bioensayos de laboratorio, invernadero y campo que confirmen la efectividad del producto una vez formulado (Carballo, 2010, p.47).

En condiciones de laboratorio es difícil mantener la viabilidad de hongos entomopatógenos por mucho tiempo. De esta manera, formular un entomopatógeno consiste en adicionarle determinados compuestos que mejoran su desempeño en el campo, facilitando su manejo, aplicación que permita su almacenamiento en condiciones que disminuyen el costo, con una pérdida mínima de las cualidades del producto. Para ser formulado, la viabilidad del hongo no debe ser menor de 95 % y el contenido de humedad entre 4 - 6 %.

Los materiales utilizados en la formulación no deben tener actividad biológica; ni afectar la actividad del hongo, deben ser inocuos al ambiente, presentar características físicas adecuadas

para mezclarse con los conidios; facilitar la aplicación del producto y ser económicamente rentables (Monzón, 2011, p.95-103).

1.6 Curva de crecimiento microbiano

En la figura 4-1 se representa cada una de las fases del crecimiento que realizan los microorganismos en función del tiempo.

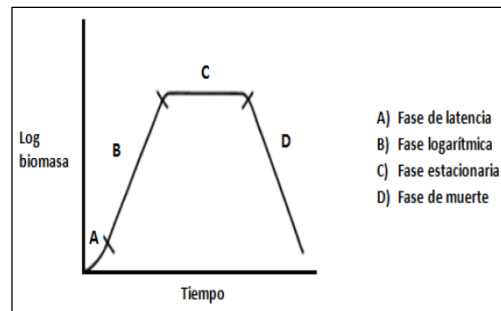


Figura4-1: Curva de crecimiento microbiano
Fuente: (Poalacín. J, 2015, p. 16)

El tiempo que dura cada una de estas fases depende de varios factores entre estos se tiene el tipo de microorganismo, la familia a la que este pertenece, entre otros aspectos. En la curva que un microorganismo describe durante su crecimiento se pueden apreciar cuatro fases muy marcadas las mismas que son fase de latencia, fase exponencial o logarítmica, fase estacionaria y la fase de muerte celular (Poalacín. J, 2015, pp. 16-17).

1.6.1 Fase de latencia

Fase en la que los microorganismos comienzan su adaptación las nuevas condiciones nutricionales y ambientales para iniciar su crecimiento. Esta fase comienza en seguida en la que se realizó la inoculación y el tiempo que dura depende del estado fisiológico de la célula que se inoculará así como también de las condiciones ambientales del medio en la que se desarrolla. Durante el tiempo que dure esta fase la cantidad de células no se multiplican, puesto que los microorganismos emplean la energía disponible para sintetizar las enzimas necesarias para desarrollarse en su nuevo medio (Poalacín. J, 2015, pp. 16-17).

1.6.2 Fase logarítmica

Esta etapa es una de las más importantes, pues es aquí en la que las células se multiplican en su máxima velocidad, el crecimiento de las células se puede cuantificar en función al número de

células producidas por unidad de tiempo esto para levaduras y bacterias o por el aumento en la biomasa por unidad de tiempo para hongos filamentosos. La velocidad de crecimiento en esta fase es permanente, constante e independiente de la concentración del sustrato, siempre y cuando la sustancia este en cantidad excesiva (Poalacín. J, 2015, pp. 16-17).

1.6.3 Fase estacionaria

Es la fase en la que la velocidad de crecimiento o reproducción del microorganismo es igual a la velocidad en la que muere. Si la población microbiana no se reproduce ni muere, el número de células es contante y la longitud de la fase varía y depende del equilibrio que logren las células con el medio en el que se desarrollan, es aquí donde se logra un equilibrio celular. Esta fase se da por terminado cuando se produce cualquiera de estos tres eventos, los nutrientes se termina, las condiciones ambientales más importantes para las células son modificadas o cuando las células producen metabolitos tóxicos que limitan su reproducción (Poalacín. J, 2015, pp. 16-17).

1.6.4 Fase de muerte

Se da inicio cuando los nutrientes del medio de cultivo son insuficientes para que los microorganismos puedan reproducirse y a pesar que existan células vivas estas son superadas por el número de células muertas. Otro para que se produzca esta esta fase se debe a la acumulación de varias sustancias toxicas que se generan durante el metabolismo realizado por los microorganismos (Poalacín. J, 2015, pp. 16-17).

1.7 Factores que influyen en el desarrollo fúngico

Según Acevedo *et al.* (2010), indica que los hongos, al igual que otros organismos que se desarrollan en el suelo, requieren de ciertas condiciones esenciales para sobrevivir y desarrollarse; la presencia de éstos está directamente relacionada con la composición química del suelo, la cantidad de materia orgánica, las condiciones ambientales y el pH del suelo. Las infecciones por hongos, especialmente las epizootias (poblaciones del hongo del suelo), son altamente dependientes de la población del hospedero en condiciones climáticas ideales. Se requiere una adecuada humedad y temperatura para el éxito en la esporulación y germinación de las esporas (Cruz, 2013).

1.7.1 Temperatura

La temperatura es uno de los factores abióticos importantes para los hongos entomopatógenos, ya que puede afectar la germinación de las esporas, el desenvolvimiento y penetración del tubo germinativo, la colonización y reproducción, la velocidad de desarrollo micelial en el insecto y la velocidad de la evolución de la enfermedad. Temperaturas muy bajas o altas afectan la estabilidad de los patógenos en el almacenamiento, durante las aplicaciones en campo y la ocurrencia natural en el agro ecosistema. El óptimo de temperatura es entre 20 y 30 °C con límites entre 5 y 35 °C. Sin embargo, temperaturas bajas entre 10 y 15 °C, aseguran la supervivencia de las esporas, permitiendo así la presencia en el medio (Cruz, 2013).

1.7.2 Humedad

La humedad relativa actúa en la germinación y penetración y se considera indispensable para la reproducción de los hongos entomopatógenos. Por otro lado, mientras que la temperatura afecta la velocidad del proceso de la enfermedad, la falta de humedad adecuada puede perjudicar además el establecimiento de una epizootia, desde que ella ocurra en la fase reproductiva del microorganismo. Los hongos patógenos de insectos y ácaros, cumplen los procesos de penetración, infección, desarrollo hifal y esporulación, en ambientes con adecuada saturación de agua mayor del 90%, factor necesario para que se desarrollen nuevas epizootias; sin embargo, dentro del insecto muerto, las esporas pueden resistir bajas humedades relativas. A pesar de que la humedad es un requerimiento importante para la germinación de conidias y la supervivencia de los hongos entomopatógenos, en condiciones secas, muchos hongos pueden sobrevivir gracias a la formación de estructuras de resistencia (Cruz, 2013).

1.7.3 pH

Generalmente los hongos requieren para su crecimiento un pH óptimo por debajo de 5.0, de esta manera el desarrollo se ve favorecido en suelos ácidos (Cruz, 2013).

1.7.4 Radiación Solar

La luz solar actúa en la germinación de las esporas y en el estado inicial de crecimiento. Cuando hay exposición directa de los rayos solares, disminuye notablemente la capacidad de esporulación y hay inhibición en la germinación de esporas hasta en un 50%. Por lo anterior se recomienda, en lo posible, cubrir el inoculo con un poco de suelo, inmediatamente de realizar la aplicación (Cruz, 2013).

1.7.5 Materia Orgánica

Es de gran importancia que el suelo donde se establecen los hongos entomopatógenos contenga más del 10%, de materia orgánica, ya que ésta le va a proporcionar los nutrientes necesarios para que el hongo pueda establecerse y desarrollarse (Cruz, 2013).

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Estudio

2.1.1 Datos Generales de Ubicación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la ciudad Riobamba, Provincia de Chimborazo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en el Departamento de Sanidad Vegetal y Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales con la Unidad de Producción de Microorganismos Antagonistas y Entomopatógenos (MIKROBEN).

2.2 Tipo y Diseño de Investigación

2.2.1 Por el tipo de investigación

Aplicada porque persigue un fin directo e inmediato que propone determinar la estabilidad y viabilidad de *Trichoderma harzianum* en cinco sustratos para la preparación de un bioformulado líquido, y precisar su mejor aprovechamiento para disminuir costos de producción.

2.2.2 Por la temporalidad

Longitudinal, ya que se recolectó datos a través del tiempo en puntos o periodos específicos para hacer inferencias respecto al desarrollo evolución y variación en el crecimiento y estabilidad de *Trichoderma harzianum* en el bioformulado líquido.

2.2.3 Por el tipo de enfoque

Cuantitativo ya que la recolección de datos se lo hizo a diario para la obtención de los resultados de estabilidad y viabilidad, los datos fueron físicos y microbiológicos, se probó una hipótesis con base al análisis estadístico.

2.2.3 Por el diseño de investigación

Experimental

2.3 Diseño Experimental

Se enfocó principalmente empleando un Diseño Completo al Azar DCA con cinco sustratos a 3 temperaturas y 3 repeticiones en las pruebas de laboratorio para determinar el crecimiento y estabilidad poblacional de *Trichoderma harzianum*.

Tabla 1-2: Tratamientos a nivel de laboratorio para determinar la viabilidad y estabilidad

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
T1	Bioformulado de harina de trigo a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 4°C.
T2	Bioformulado de harina de cebada a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 4°C.
T3	Bioformulado de harina de quínoa a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 4°C.
T4	Bioformulado de harina de plátano a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 4°C.
T5	Bioformulado de harina de arroz a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 4°C.
T6	Bioformulado de harina de trigo a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 18°C.
T7	Bioformulado de harina de cebada a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 18°C.
T8	Bioformulado de harina de quínoa a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 18°C.
T9	Bioformulado de harina de plátano a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 18°C.
T10	Bioformulado de harina de arroz a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 18°C.
T11	Bioformulado de harina de trigo a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 22°C.
T12	Bioformulado de harina de cebada a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 22°C.
T13	Bioformulado de harina de quínoa a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 22°C.
T14	Bioformulado de harina de plátano a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 22°C.
T15	Bioformulado de harina de arroz a base de <i>Trichoderma h.</i> a temperatura de 22°C.

Fuente: Verónica Guilcapi 2016

2.4 Unidad de análisis

En el presente estudio se presentó como unidad de análisis:

- Cinco sustratos (Harina de Trigo, harina de Cebada, Harina de Plátano, Harina de Quínoa, Harina de arroz).
- Cepa de *Trichoderma harzianum*.

2.5 Población de Estudio

La población de estudio correspondió a los cinco bioformulados preparados con cada sustrato a partir de una cepa de *Trichoderma harzianum* y conservados a tres temperaturas.

2.6 Tamaño de Muestra

- 5 tratamientos almacenados a 4°C.
- 5 tratamientos almacenados a 18°C.
- 5 tratamientos almacenados a 22°C.

2.7 Selección de la Muestra

2.7.1 *Material biológico*

El material biológico estuvo conformado por una cepa de *Trichoderma harzianum*. y sustrato sólido previamente preparado y esterilizado con cascarilla de arroz, arrocillo y una fuente de nutrientes (melaza) y cinco sustratos que sirve de fuente de nutrición para el antagonista en la preparación del bioformulado.

2.8 Técnicas de Recolección de Datos

2.8.1 *Fases de laboratorio*

- Aislamiento y Purificación de *Trichoderma harzianum*.
- Identificación molecular de *Trichoderma harzianum*.
- Preparación de sustrato sólido.
- Inoculación del microorganismo *Trichoderma harzianum*.
- Preparación del Bioformulado con cada sustrato.
- Cuantificación de esporas del Bioformulado.
- Evaluación de la viabilidad.

2.9 Mecanismos

2.9.1 *Aislamiento y Purificación de Trichoderma harzianum*

- Se tomó una muestra de suelo, se secó a temperatura ambiente y se tamizó.
- Se tomó 10 g de suelo y se añadió en 90 ml de agua para formar una suspensión terrosa y agitamos por 20 minutos y dejamos reposar por 5 minutos.
- En la cámara de inoculación se preparó las cajas madre con 12 ml de PDA por el método de placa pobre, con un inóculo de 1 ml de suspensión terrosa.

- Con la ayuda de un sacabocados de 4mm de diámetro se procedió a picar en la caja madre y se obtuvo de 90 a 100 círculos, los mismos que fueron transferidos a 3 cajas hijas que contenían la misma cantidad de agar y alrededor de 30 círculos distribuidos en toda la caja.
- Las cajas hijas resultantes fueron incubadas a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ en ausencia de luz por el lapso de 5 días, luego de este tiempo son transferidos a la luz por 2 días.
- Luego del tiempo de incubación se reconoció las colonias de *Trichoderma sp.* crecidas sobre los círculos.
- Con la cepa obtenida se observó al microscopio bajo ciertas claves que caracterizan a la cepa *Trichoderma harzianum*.
- Después de corroborar la morfología de la cepa de *Trichoderma harzianum*, se realizó la reactivación
- La reactivación se llevó a cabo en cajas Petri de vidrio, que contenían 15 ml de Agar PDA (Potato Dextrosa Agar), a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Se realizó una siembra de una pequeña porción de micelio joven de la caja madre, con asa descartable y se inoculó en cajas Petri de vidrio con medio agar PDA a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.9.2 Identificación molecular de *Trichoderma harzianum*

Se envió una caja pura con la cepa de *Trichoderma sp.* al INIAP estación Santa Catalina para la Secuenciación de ADN de muestras fúngicas empleando los marcadores ITS1/ITS4.

2.9.2.1 Extracción de ADN

Plaza *et al.*, (2004), con modificaciones. Para el aislamiento del ADN se recolectaron de 200 a 400 mg de micelio fresco del hongo en microtubos de 2 mL, la muestra se resuspendió en 500 μL de buffer de extracción (0,1 M NaCl, 0,5 M Tris- HCl pH 8.0, 5% de SDS) y se maceró con ayuda de arena de cuarzo por 10 minutos, se centrifugó a 13.000 rpm y se recuperó sobrenadante. Al pellet formado, se le adicionó nuevamente 500 μL de buffer de extracción y el proceso de maceración y centrifugación se repitió. Al sobrenadante recuperado se le agregó igual volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vótex vigorosamente; se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos y cuidadosamente se tomó la fase acuosa en un nuevo tubo. Se agregó igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente y se centrifugó por 5 min a 13.000 rpm. Se colocó la fase acuosa en un nuevo tubo, para la precipitación del ADN se añadió 600 μL de isopropanol (-20°C), se mezcló por inmersión y se almacenó en hielo por una hora. Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 10 min. El pellet de ADN se lavó

dos veces con etanol al 70% y se secó a 37°C por 20 min para finalmente ser resuspendido en 50 µL de buffer TE (0.1M, pH8).

2.9.2.3 Cuantificación ADN:

Para determinar la concentración de ADN se utilizó el espectrofotómetro Epoch®, empleando el software Gen5 2.

2.9.2.4 Amplificación marcadores ITS1/ITS4

Para la amplificación se empleó el Mix detallado en la tabla 2-2, y el programa de amplificación descrito en la tabla 3-2.

Tabla 2-2: Mix PCR para la amplificación de los marcadores ITS1/ITS4

Componentes	Concentración Inicial	Concentración final	Volumen para una reacción
AGUA			14,5 uL
BUFFER	5X	0,5 x	2,5 uL
MgCL2	25mM	1,5 mM	1,5 uL
dNTPs	2,5mM	0,1 mM	1 uL
PRIMER ITS1	5uM	0,4 uM	2 uL
PRIMER ITS4	5uM	0,4 uM	2 uL
TAQ POLIMERASA	5U/uL	0,1 U/uL	0,5 uL
AND	20 mg/uL	0,8 mg/uL	1 uL

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013)

Tabla 3-2: Programa de amplificación para los marcadores ITS1/ITS4

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95 °C	5 min
35 ciclos	94°C	1 min
	55°C	2 min
	72 °C	1 min
1 ciclo	72 °C	10 min
1 ciclo	4°C	∞

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013)

2.9.2.5 Secuenciación:

Para el proceso de secuenciación fue necesario realizar réplicas de la amplificación, se realizó 4 repeticiones por cada muestra, con el objeto de contar con suficiente concentración del amplicón, considerando que este fue purificado. Para este procedimiento se empleó el kit de purificación de

producto PCR PureLink® PCR Purification Kit - Life Technologies(no. catK3100-01) siguiendo las especificaciones del fabricante. Con el producto PCR purificado se realizó la reacción de secuencia con el Kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit, siguiendo las especificaciones del fabricante para un volumen de 10 uL de reacción y para la purificación el método de precipitación con EDTA/Etanol. La secuenciación de las muestras se realizó en el ABI PRISM 310 y fueron analizadas con el software Sequencing Analysis 5.3.1

2.9.3 Preparación del sustrato sólido

El proceso de fermentación sólida en frascos de vidrio se lo realizó utilizando como inóculo un fragmento de cultivo puro de aproximadamente 1 cm² de la cepa CCCh-p1 sobre el sustrato (arroz partido + cascarilla de arroz), después del proceso de almacenamiento de *T. harzianum* se procedió a retirar el producto sólido de los frascos, previamente se garantizó la calidad del producto sólido con la desinfección diaria en el área de almacenamiento.

- El sustrato se seleccionó eliminando residuos, una vez que la cascarilla de arroz fue liberada de impurezas, se le sometió a remojo por 24 horas en una solución acuosa de melaza al 1%, transcurrido este tiempo se desechó el excedente de agua.
- Se necesitó 80 g de sustrato; es decir, la mezcla de arrocillo y cascarilla de arroz, y se lo almacena en una botella de boca ancha de vidrio.
- Estos frascos que contienen sustrato se sellan con papel kraft, se esterilizan en el autoclave a 121°C y a una atmósfera de presión por el lapso de una hora (Figura 1-2).

Figura 1-2: Preparación de sustrato sólido



Fuente: Verónica Guilcapi

2.9.4 Inoculación del microorganismo *Trichoderma harzianum*

- Una vez que se obtiene el sustrato estéril, se procedió a homogenizar para desagregar los grumos y evitar la compactación del sustrato.

- Se preparó la solución acuosa con la cepa de *Trichoderma harzianum* mas antibiótico y 500 mL de agua estéril.
- A continuación se tomó una alícuota de 5 ml de la solución acuosa antes preparada, y se inoculó en los frascos de sustrato.
- Se colocaron los frascos con el inóculo en la cámara de incubación y se incubó por 8 días a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.9.5 Preparación del bioformulado líquido

Para la obtención del bioformulado líquido de *Trichoderma harzianum*, se preparó una suspensión de elementos nutritivos a base de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, cobre, magnesio, manganeso, hierro, oligosacáridos y fitohormonas, que favorecieron su multiplicación, una rápida esporulación y sobrevivencia del antagonista. Seguidamente se procedió a partir del producto crecido en cascarilla de arroz + arrocillo (figura 2-2). Al producto final obtenido se le retiró el material sólido sobrante para ser empacado en botellas plásticas de 1 litro.



Figura 2-2: Bioformulado líquido
Fuente: Verónica Guilcapi

- **Preparación de bioformulado con harina de trigo (*Triticum vulgare*)**

Separamos una cantidad conocida de harina de trigo previamente eliminamos las impurezas, preparamos a fuego lento la formulación en un tiempo estimado el volumen deseado, adicionamos coadyuvantes y conidios de *Trichoderma harzianum* que están contenidos en el sustrato sólido y se utiliza 1 Kg aproximadamente en todos los tratamientos logrando alcanzar una densidad de $\delta = 1.0081 \text{ g/mL}$ parámetro físico que garantiza la calidad del biofungicida.

- **Preparación del bioformulado con harina de cebada (*Hordeum vulgare*)**

Utilizamos preparación cocida de este sustrato al que le adicionamos coadyuvantes y aproximadamente 1 Kg de sustrato sólido el mismo que contiene los conidios de esporas de *Trichoderma harzianum* hasta obtener un volumen conocido y garantizar las propiedades del producto a una densidad de $\delta = 1.026$ g/mL.

- **Preparación del bioformulado con harina de quinua (*Chenopodium quinoa*)**

Preparamos la formulación con el sustrato harina de quíñua, de este se requiere poca cantidad de sustrato por sus propiedades le ajustamos al volumen deseado y alcanzamos una densidad $\delta = 0.98842$ g/mL.

- **Preparación del bioformulado con harina de plátano (*Musa paradisiaca*)**

Por su gran contenido de gluten y vitaminas se utiliza cierta cantidad de sustrato con la adición de coadyuvantes y conidios de *Trichoderma h.* hasta alcanzar una densidad de $\delta = 1.0303$ g/mL.

- **Preparación del bioformulado con harina de arroz (*Oryza sativa*)**

Para la preparación de las formulaciones usamos sustrato cocido la adicionamos coadyuvantes y el material biológico procurando alcanzar una densidad de $\delta = 1.0303$ g/mL.

2.9.6 Cuantificación de esporas del bioformulado

Los datos obtenidos fueron representados en curvas de crecimiento con la finalidad de observar las fases de crecimiento y determinar el desarrollo del hongo *Trichoderma harzianum* en cada sustrato, el conteo de esporas se lo realizó durante 60 días mediante la técnica de diluciones sucesivas y con la ayuda de la cámara de Neubauer.

- Para la determinación del número de esporas por ml de producto se prepararon diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) del bioformulado líquido con el fin de facilitar el conteo en la cámara de Neubauer.
- Para obtención de la primera dilución (10^{-1}), se transfirió con una pipeta estéril 10 mL del bioformulado a un Erlenmeyer con 90 mL de agua estéril, y se la agitó fuertemente durante 1 min; luego procedimos a continuar con la dilución (10^{-2}), se tomó 1ml de la dilución de bioformulado (10^{-2}) y se transfirió al tubo de ensayo de la dilución (10^{-3}) con 9 mL de agua estéril y se agitó.
- Se tomó el tubo de la dilución de la muestra a analizar y se la agitó durante 30 segundos. Inmediatamente después se tomó la muestra de 10uL (0.01 mL) con una pipeta automática para ser depositado en la cámara. Se dejó reposar medio minuto antes de proceder al conteo.

- El mismo procedimiento se repitió tres veces, y aprovechamos que la lámina de vidrio tiene dos cámaras de 0.1mm² para utilizarla.
- Luego se llevó la cámara al microscopio y se procedió a realizar el conteo respectivo con el objetivo de 40X.
- Cinco de estos cuadrados se utilizó para el conteo de las conidias. Se debe dar especial atención al hecho de que la cámara se encuentra delimitada por tres líneas blancas entre los cuadrados. Esto es importante para definir cuáles son las conidias que se encuentran en el límite y que deben ser contadas. Generalmente se cuentan los conidios que están en la primera línea de arriba y de la derecha, no así las conidias que se encuentran en la línea de abajo y de la izquierda.
- La concentración de esporas por mL de producto se calculó multiplicando la suma del número de esporas contadas en los cinco cuadrados secundarios, por el inverso de la dilución empleada y por el factor de la cámara, mediante la siguiente fórmula.
- Número de esporas/mL = Suma de 5 C.S. x factor de dilución x 50.000

2.9.7 Evaluación de la viabilidad

El número de conidias se evaluó mediante la técnica del microcultivo.

- Se preparó un medio de cultivo de agar-agua al 3%, esterilizamos junto con el material de vidrio a 121°C y a una atmósfera de presión por el lapso de una hora.
- Posteriormente se depositó una gota de medio de cultivo agar-agua sobre el portaobjetos distribuí uniformemente con la ayuda de otro portaobjetos en toda la placa.
- Inoculamos con la ayuda de una pipeta una gota de la dilución (10⁻³) y colocamos en el portaobjetos y lo cubrimos.
- Colocamos el material en una cámara húmeda la cual consiste en añadir una alícuota de agua estéril de 5mL en una caja Petri y con la ayuda de un triángulo de vidrio usamos como soporte para las placas.
- Incubamos a una temperatura de 28°C durante 24 horas, y realizamos 3 repeticiones por cada sustrato y por cada temperatura.
- Para el conteo se lo hizo con la ayuda del microscopio con el objetivo de 40X, enfocamos la parte donde se observó más crecimiento de esporas contamos todas las esporas que se observó en el campo visual.
- Obtuvimos los cálculos correspondientes con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{\text{Esporas germinadas} - \text{Esporas no germinadas}}{\text{Esporas germinadas}} * 100\%$$

CAPÍTULO III

3.1 MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

3.2 Caracterización de la cepa de *Trichoderma harzianum*

3.2.1 Características morfológicas

La cepa de *Trichoderma harzianum* se caracterizó por su rápido crecimiento en medio PDA a $27\pm 1^\circ\text{C}$ y la producción de conidios en presencia de luz. Los caracteres culturales (color de la colonia, color del reverso, esporulación), muestra que en este medio de cultivo al comienzo la cepa dió un color blanco o amarillo pálido y posteriormente verde o verde amarillo estas características coinciden con lo mencionado por Castro *et al.*, 2015.

La morfología de la cepa en estudio es análoga con las descripciones realizadas por otros autores para el género *Trichoderma* (Rifai, 1969; Bisset, 1991; Samuels *et al.*, 2006). Estas incluyeron hifas hialinas, septadas y de paredes finas, conidióforos hialinos, generalmente ramificados que se forman de las hifas en un ángulo de 90° y en ocasiones llegan a tener una disposición piramidal, fiálides hialinas, que pueden ser solitarias o dispuestas en verticilos y producen los conidios en el extremo, La cepa de *Trichoderma harzianum* produjo conidios y clamidosporas en condiciones de incubación evaluadas. Estas últimas se observaron terminales o intercalares, estas características fueron similares a las encontradas por Flores, 2015.



Figura 1-3: Cepa de *Trichoderma harzianum* en medio PDA después de 5 días de incubación a $27\pm 1^\circ\text{C}$ y luz continua.

Fuente: Verónica Guilcapi

La cepa proveniente del Banco de Cepas del Laboratorio de Fitopatología ESPOCH, *Trichoderma harzianum*, está codificada como: CCCh-p1 la misma que fue recolectada en la Prov. De El Oro en el cantón Pasaje en la localidad Hacienda Pio IV-Pasaje-Buena Vista ubicada en la región Costa de nuestro País. La cepa fue de crecimiento rápido en PDA, con abundante esporulación que cubrió toda la superficie del medio de cultivo, de textura pulverulenta, micelio aéreo blanquecino con pústulas planadas de color verde., estas características se las observa en la figura 1-3. El reverso de las colonias varió de blanquecinas amarillo pálido. Hifas y conidióforos hialinos, paredes lisas, rectos o doblados ramificados. Las fiálides se observaron ampuliformes constreñidas en la base y los conidios subglobosos de paredes lisas y color verde claro. Clamidosporas solitarias. Homología con secuencias en bases de datos empleadas del 99,0% (Castro, 2015; Flores 2015).

Tabla 1-3: Características de los conidios de *Trichoderma harzianum*.

Código	CONIDIOS					
	Forma	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Relación L/A	Ornam.	Color
CCCh-p1	Subglobosos	3,0-3,5 (3,3)	2,7-4.4 (3,5)	0,8-1,1 (0,9)	Lisos	Verde claro

Ornam. Ornamentación de los conidios

Realizado por: Verónica Guilcapi

Fuente: CASTRO R, 2015

Como se describe en la tabla 1-3, los conidios de *Trichoderma harzianum* son de forma elipsoidal, ornamentación suave y pigmentación verde, Conidióforos con pelos estériles derivados de conidióforos o pústula ausentes, pelos fértiles derivados de conidióforos o pústula ausentes y pústulas no formadas o vagamente formadas, Fiálides con una longitud de 6.5-6.7 µm, fiálides proliferantes en verticilos de 2-4, punto medio (1.6-)2.5-3.5(-4.5) µm, base (1.0-)1.6-2.5(-3.5) µm, soporte celular (1.5-)2.4-3.6(-5.6) µm, relación entre la longitud y el punto más ancho 2.1-2.2µm, relación entre la longitud y el apoyo a la célula (1.0-)1.5-3.0(-9.5)µm, relación entre la parte más ancha de la anchura de apoyo de células (0.3-)0.5-0.9(-1.6)µm, fiálides intercalares no forma, Clamidosporas de forma redonda a elipsoidales con un ancho de (4.0-6.0)a (9.7-15.0) µm, no presenta olor distintivo, no crece sobre PDA a 40 °C. Ascosporas de forma cilíndrica y verrugosa, color verde, distal longitud parcial de (2.8-) 3.3-4.1 (-4.8) µm, proximal longitud parcial de (2.9)-3.4-4.3 (-5.4) µm, proximal anchura parcial de (2.1-) 2.7-3.7 (-4.6) µm, la descripción se observa en la figura 2-3. Las características de *Trichoderma harzianum* identificadas en este ensayo, se destacan en otras investigaciones Rifai, 1969; Samuels, 1998; (Flores, 2015; Castro, 2015).

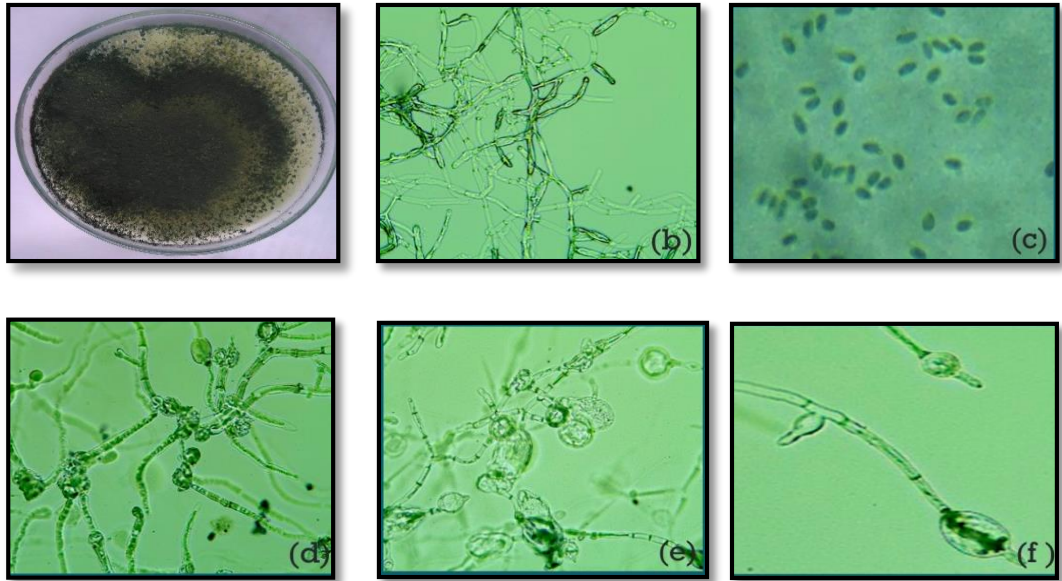


Figura 2-3: Identificación morfológica de *Trichoderma harzianum*
a) *Trichoderma harzianum*, b) Conidióforos, c,d,e,f) Clamidósporas

Fuente: Verónica Guilcapí

3.2.2 Características moleculares

Se caracterizó la cepa nativa biocontroladora *Trichoderma harzianum*, con diferentes requerimientos nutricionales y alta similitud genética en comparación con otras cepas almacenadas del repositorio de cepas.

La extracción del ADN del material fúngico presentó la precipitación del ácido como se muestra en la figura 3-3.

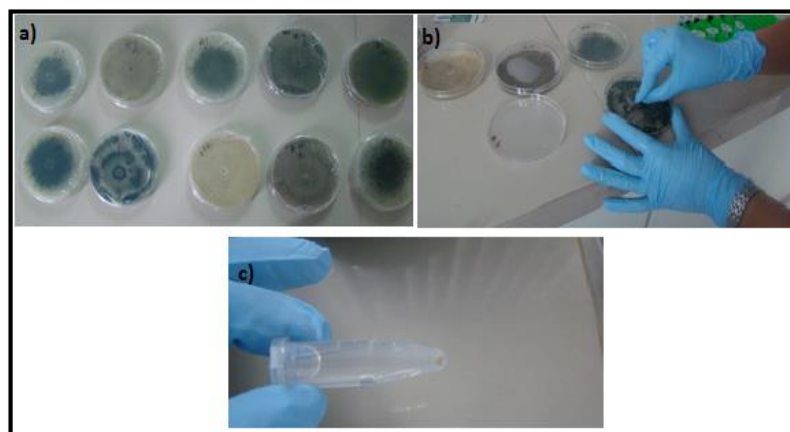


Figura 3-3: a) Cultivos de hongos frescos para extracción de ADN. b) Obtención de micelio fresco mediante raspa para extracción de ADN. c) Finalización de la extracción de ADN, precipitación del ácido (pellet) con isopropanol.

Fuente: Flores, 2015.

Cuantificación de ADN:

El detalle de la cuantificación de la pureza del ADN es de 2.008 y con una concentración en la muestra de 174 mg/μL.

Amplificación ITS1/ITS4:

La amplificación de la muestra es de aproximadamente 560 pb como se muestra en la figura 4-3.



Figura 4-3: Amplificación de los marcadores ITS1/ITS4. M: marcador de talla. CP: control positivo de la reacción de amplificación. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013)

Tabla 2-3 Identificación molecular de *Trichoderma harzianum* por secuenciación

MUESTRA	SECUENCIA ITS 1 (PB)	VALOR Q (%)	SECUENCIA ITS 4 (PB)	VALOR Q (%)	SECUENCIA CONSENSO (PB)	BLAST	% IDENTIDAD
1	537	89,9	500	80,2	445	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	100
						<i>Trichoderma viride</i>	100
						<i>Hypocrea sp.</i>	100
						<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	100
						<i>Hypocrea jecorina</i>	100
						<i>Hypocrea koningii</i>	100
						<i>Trichoderma harzianum</i>	99
						<i>Trichoderma sp</i>	100

Muestra 1: CCCCh-p1 *Trichoderma harzianum*

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013)

Secuencia Consenso Muestra 1: Código CCCh-p1

CGGATCCCATGGCGCCCCGCCGAGGACCAACTCCAAACTCTTTTTTCTCTCCGTCGC
GGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCG
GGCGTCTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCG
AGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCT
CACCGGGCCGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGT
AGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGGCGGCCACAGCCGTAATAACAC

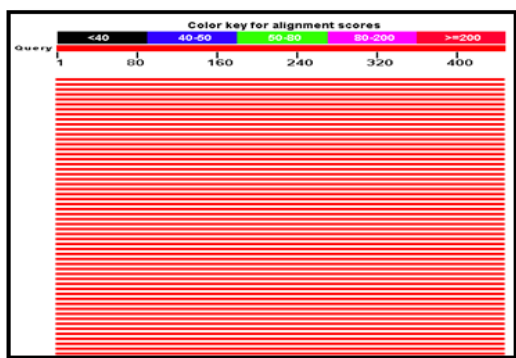


Figura 5-3: Secuenciación CCCh-p1

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP, 2013)



Figura 6-3: *Trichoderma harzianum* CCCh-p1

Fuente: Verónica Guilcapi

Los siguientes mecanismos como la interacción de *Trichoderma* con la planta, la protección directa o a través de inducción, apoyados en caracterizaciones biológicas y moleculares, etc. Estos mecanismos son verificados por muchos investigadores (Chet, 2008; Harman, 2008; Lorito, 2008; Jiménez *et al.* 2008; Zambrano *et al.* 2013).

Los resultados obtenidos en este ensayo se asemejan a muchas investigaciones realizadas con *Trichoderma* desde simples aislamientos y multiplicación en los años 80 (Zambrano, 2013) hasta la caracterizaciones moleculares realizadas en la actualidad por Castro (2015); Flores (2015). quienes identifican las especies de *Trichoderma* analizando las mismas secuencias de los espaciadores transcritos internos del DNA ribosomal (ITS 1 y 2) y el factor de elongación de la traducción 1^a (*tef1*) con los programas TrichoOKEY, TrichoMARK y TrichoBLAST (www.isth.info) que se han utilizado en esta investigación y los resultados fueron acertados.

Flores (2015) propone que los estudios más altamente reproducibles son los que se realizan a nivel de ADN (moleculares). Castro (2014) en su investigación menciona lo siguiente, para que

el aislado sea reconocido como apropiadamente caracterizado requiere de al menos un método molecular que lo identifique como tal y en la fase de registro de un producto internacionalmente esta condición es exigida en países líderes en biocontrol.

Los estudios moleculares empleados en esta investigación, son los más usados en hongos para la caracterización en los cuales se generan cortes por enzimas de restricción en el ADN dando lugar a fragmentos de diversas tallas, los que son puestos en contacto con sondas específicas marcadas con un cromógeno o con un isótopo radiactivo, que pueden o no acoplarse al o los fragmentos producidos por complementariedad de bases (hibridización) y luego de una electroforesis en gel de agarosa se genera un patrón de bandas en dependencia de la sonda de hibridización, el aislado y la enzima empleada en el corte del ADN, lo cual logra discriminar aislados aparentemente iguales como diferentes cepas Castro (2014).

Mediante los resultados obtenidos de acuerdo con la identificación morfológica y molecular de la cepa CCCh-p1 en el presente estudio, se concluye mencionando que pertenece a *Trichoderma harzianum*.

3.3 Preparación del bioformulado

Terminado el proceso fermentativo se obtuvo una concentración de esporas de 2.5×10^9 UFC/g la metodología y resultados utilizada y obtenida en esta investigación concuerda con los de otro autor (Castro, 2015) además indica que la obtención de un elevado número de esporas por gramo de sustrato empleado garantiza la multiplicación del antagonista y dicha concentración difiere a lo obtenido por el autor Serpa (2015) en su producto final 1.0×10^8 . Los resultados difieren por el tipo de sustrato empleado, factores ambientales y contenido nutricional de los sustratos. Otras investigaciones realizadas en trabajos de invernadero y campo se utiliza al menos una concentración de 1.0×10^8 UFC/g (Acevedo, 2010, p.258) este varía por la metodología empleada. De esta concentración obtenida se inició la preparación del biofungicida con los cinco sustratos, continuamente se controló su adaptación y desarrollo en cada sustrato almacenada a tres temperaturas.

3.4 Estabilidad del producto en 15 tratamientos

3.4.1 Curvas de crecimiento para los tratamientos a 4°C

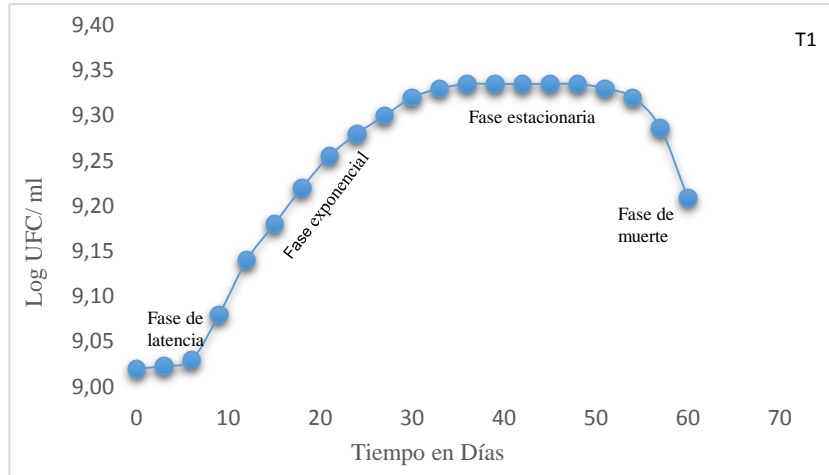


Gráfico 1-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en trigo (*Triticum vulgare*) a 4°C

Realizado por: Verónica Guilcapi, 2016

En el gráfico 1-3 los datos se presentan en la curva de crecimiento del T1 correspondiente a harina de trigo (*Triticum vulgare*) almacenado, presenta la fase de latencia hasta los 3 días con una población de $1,1 \times 10^9$ UFC/mL, seguida por la fase exponencial o crecimiento hasta los 33 días donde la concentración de esporas permanece constante hasta los 51 días con $2,23 \times 10^9$ UFC/mL y finalmente presenta la fase de muerte de $2,5 \times 10^9$ UFC/mL.

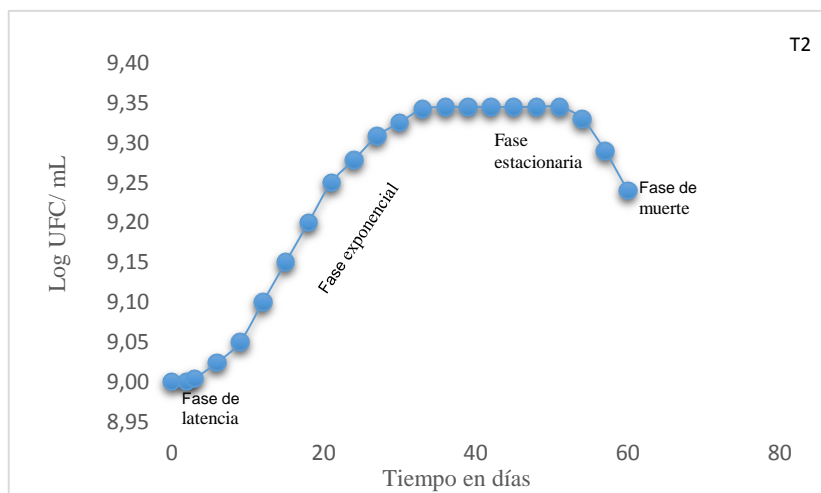


Gráfico 2-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en cebada (*Hordeum vulgare*) a 4°C

Realizado por: Verónica Guilcapi, 2016

La curva en el gráfico 2-3 se presenta T2 correspondiente a harina de cebada (*Hordeum vulgare*), indica 3 días de latencia en esta fase con una concentración de conidios de $1,33 \times 10^9$ UFC/mL, permaneció constante una concentración de $2,20 \times 10^9$ UFC/mL hasta los 48 días seguida por la fase de muerte obteniendo un resultado final de $2,65 \times 10^9$ UFC/mL durante 60 días de almacenamiento.

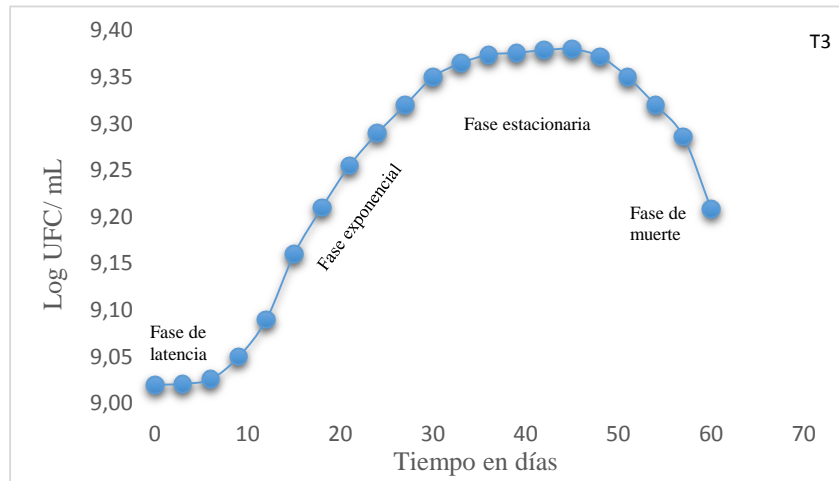


Gráfico 3-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai en quinua (*Chenopodium quinua*) a 4°C
Realizado por: Verónica Guilcapi 2016

La curva de crecimiento reflejada en el gráfico 3-3 corresponde a harina de quinua (*Chenopodium quinua*) e indica en la fase de latencia una concentración de $1,05 \times 10^9$ UFC/mL en 3 días, seguida por la fase de crecimiento y estacionaria hasta 48 días de almacenamiento del producto con una concentración de conidios de $2,35 \times 10^9$ UFC/mL a 60 días obtuvimos un resultado $1,62 \times 10^9$ UFC/mL que pertenece a la fase de muerte.

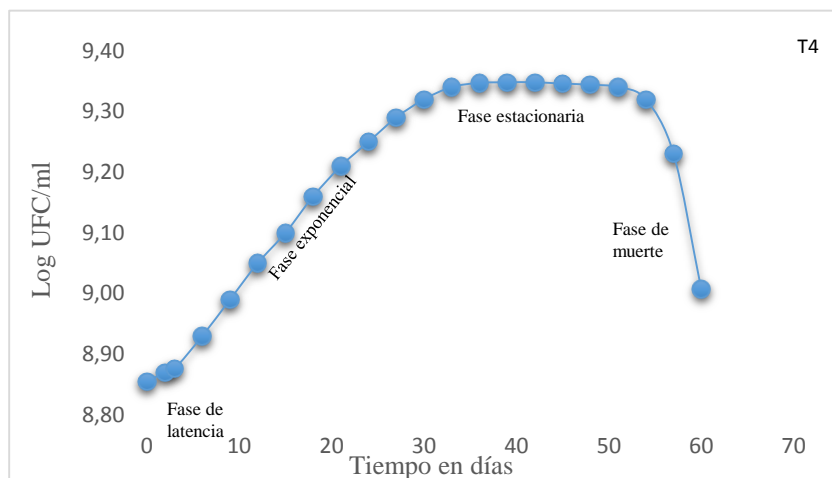


Gráfico 4-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai en plátano (*Musa paradisiaca*) a 4°C.
Realizado por: Verónica Guilcapi, 2016

El tratamiento T4 gráfico 4-3 pertenece a harina de plátano (*Musa paradisiaca*), presenta una curva de crecimiento que indica 3 días de adaptación en la fase de latencia con una población de $7,17 \times 10^8$ UFC/mL, la fase estacionaria se extiende hasta los 45 días con una concentración de $2,23 \times 10^9$ UFC/mL y finalmente en la fase de muerte $1,02 \times 10^9$ UFC/mL.

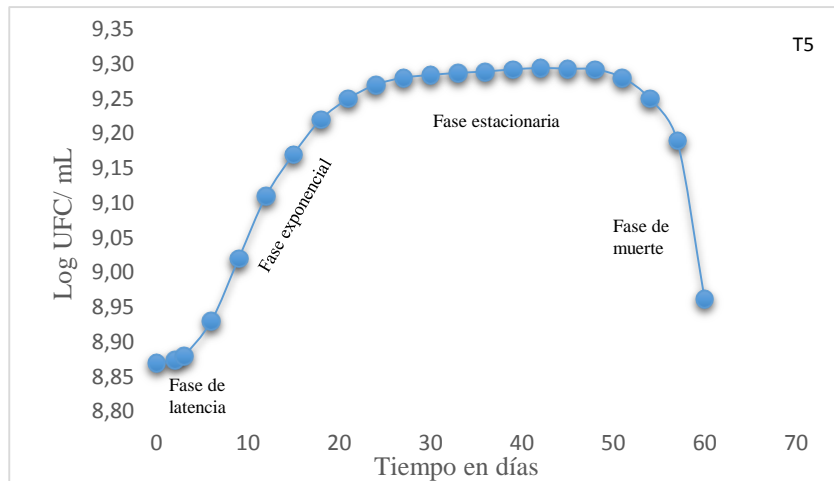


Gráfico 5-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai en arroz (*Oryza sativa*) a 4°C.

Realizado por: Verónica Guilcapi 2016

En el gráfico 5-3 los datos presentan en la fase de latencia una concentración de esporas de $7,33 \times 10^8$ UFC/mL en 3 días, la fase estacionaria los 51 días donde la concentración de esporas permanece constante $1,95 \times 10^9$ UFC/mL y finalmente presenta la fase de muerte con un resultado de $1,17 \times 10^8$ UFC/mL a 60 días.

Curvas de crecimiento de los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5

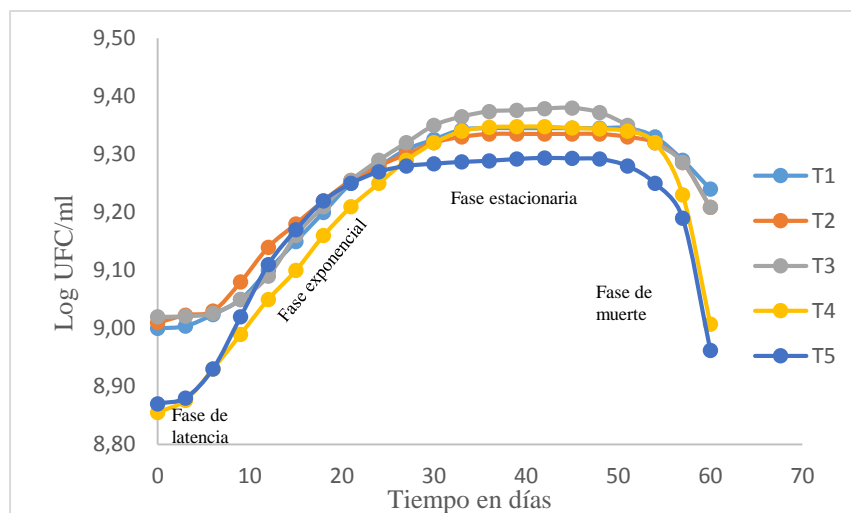


Gráfico 6-3: Curva de Crecimiento exponencial de 5 tratamientos con *Trichoderma harzianum* a 4°C

Realizado por: Verónica Guilcapi, 2016

- T1: Harina de trigo (*Triticum vulgare*) a 4°C
- T2: Harina de cebada (*Hordeum vulgare*) a 4°C
- T3: Harina de quinua (*Chenopodium quinua*) a 4°C
- T4: Harina de plátano (*Musa paradisiaca*) a 4°C
- T5: Harina de arroz (*Oryza sativa*) a 4°C

En la presente investigación el crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* Rifai es satisfactoria, almacenada a temperatura de 4°C, demostrando que el tratamiento más representativo es T3 formulación preparada con el sustrato harina de quínoa (*Chenopodium quinua*) presentando una concentración de esporas significativa en diferencia de los demás sustratos siendo un valor constante en la fase estacionaria de $2,63 \times 10^9$ UFC/mL, el valor obtenido se debió a los factores ambientales y a la composición nutricional característico de este sustrato ya que proporciona una esencial fuente de carbohidratos de 69.29% a diferencia de T4 plátano (*Musa paradisiaca*) que contiene 87.83% ya que el desarrollo del hongo en este sustrato debería ser más favorable; pero, el factor influyente es la temperatura ya que altera el pH haciendo que se desplace el equilibrio de los ácidos débiles en la formulación otro autor que informa que la concentración de esporas en medio líquido estático cuyo sustrato principal es harina de plátano al 5% alcanza un valor de $2,10 \times 10^7$ conidias/mL (Agamez *et al.*, 2010) este resultado difiere conforme a las condiciones de temperatura al que es almacenado.

El antagonista *Trichoderma harzianum* creció de manera óptima en la formulación preparada con el sustrato quínoa por la composición química que le atribuyen entre ellos Ca, P, Fe que sustituyen significativamente a los micro y macronutrientes que aportan al hongo desde el suelo y otro factor que influye en el crecimiento es la aclimatación de los microorganismos ante los nutrientes del sustrato quínoa a la temperatura almacenada en el ensayo pues no alteró sus propiedades metabólicas porque los cultivos de quínoa crecen en zonas frías de nuestro País. Este resultado lo corroboró un autor que empleó otra metodología a su ensayo con la utilización de quínoa en sustrato sólido y el rendimiento de su producto es de $2,20 \times 10^9$ UFC/g (Barboza, 2013).

El tratamiento menos favorable es T5 arroz (*Oryza sativa*) porque únicamente aporta con una cantidad suficiente de carbohidratos pero carece de compuestos químicos presentes en el suelo que nutren y aportan para el desarrollo de *Trichoderma harzianum* reportó una concentración baja de $1,92 \times 10^9$ UFC/mL en la fase estacionaria. Este resultado comparte otro autor al indicar que el sustrato arroz brindó menos capacidad de adaptación al hongo en su ensayo utilizando sustrato sólido cuya base es el arroz (Ramos, 2004).

La fase de muerte microbiana está representada por el decremento de la concentración de esporas, los resultados de esta investigación indicaron que T4 y T5 correspondiente a los sustratos de

arroz (*Oryza sativa*) y plátano (*Musa paradisiaca*) respectivamente, muestra un declive de la curva que llegan a valores de alrededor de 10^8 UFC/mL. Valores que son importante considerar en la concentración de esporas para la aplicación de control biológico en fitopatógenos, entre mayor es el valor, mejor es el resultado manifiesta Serpa, (2015).

3.4.2 Curvas de crecimiento para los tratamientos a 18°C

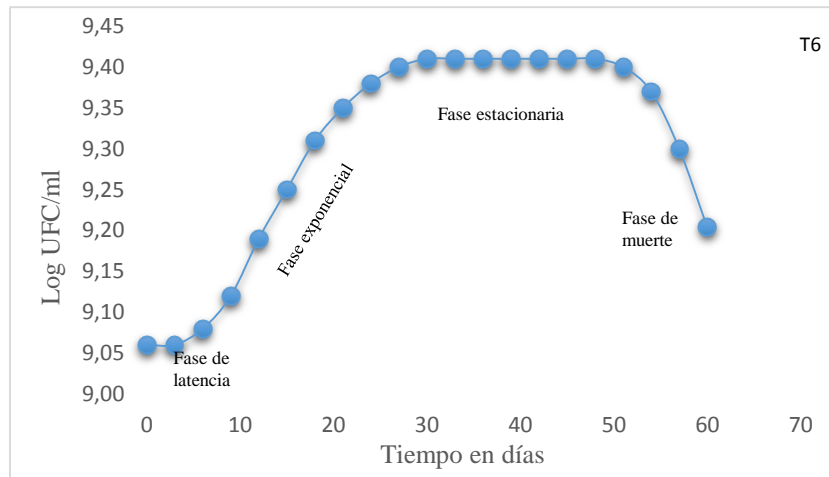


Gráfico 7-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* con trigo (*Triticum vulgare*) a 18°C
Realizado por: Verónica Guilcapi, 2016

En el gráfico 7-3 se observan los datos presentados en la curva de crecimiento en la fase de latencia presenta una concentración de $1,65 \times 10^9$ UFC/mL a 3 días, seguida de la fase de crecimiento y estacionaria la misma que se extiende hasta los 51 días con una concentración de $3,17 \times 10^9$ UFC/mL donde permanece constante y finalmente presenta la fase de declive o muerte obteniendo un resultado final de $1,55 \times 10^9$ UFC/mL.

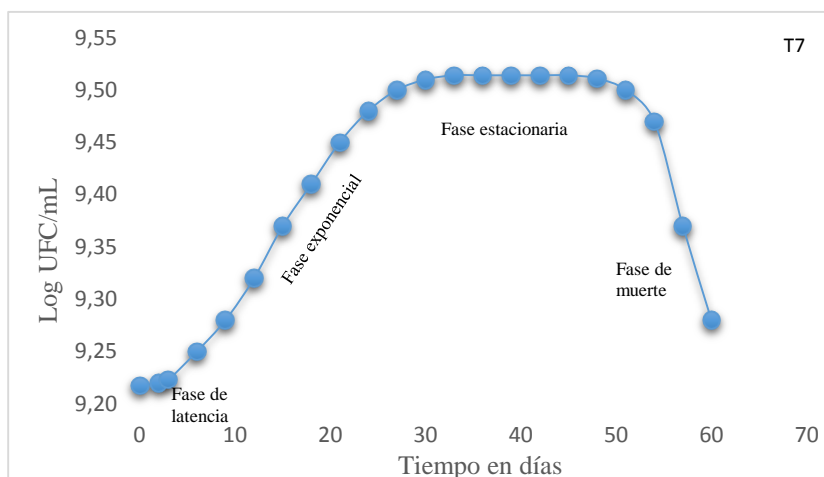


Gráfico 8-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* con cebada (*Hordeum vulgare*) a 18°C
Realizado por: Verónica Guilcapi, 2016

En la curva de crecimiento para este tratamiento gráfico 8-3 muestra la fase de latencia a 3 días con $1,15 \times 10^9$ UFC/mL de formulado, seguida de la fase de crecimiento y la fase estacionaria hasta 48 días con una concentración de $1,15 \times 10^9$ UFC/mL este ciclo concluye a 60 días con una concentración de esporas de $1,60 \times 10^9$ UFC/mL

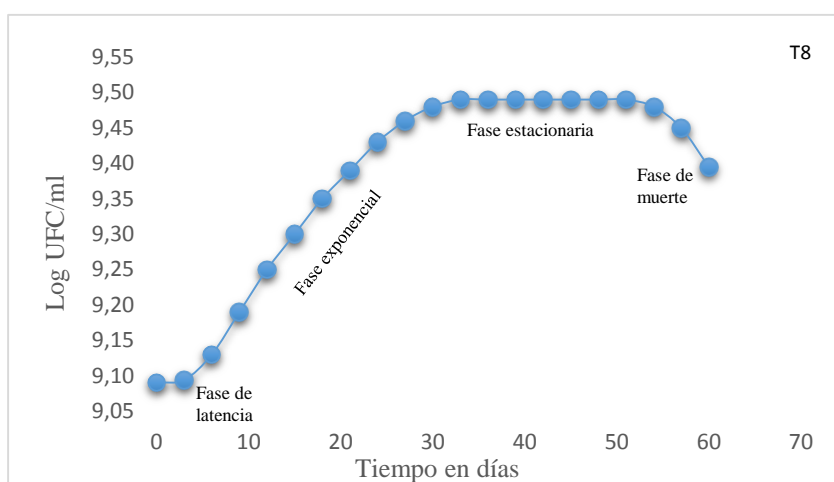


Gráfico 9-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* con quinua (*Chenopodium quinua*) a 18°C
Realizado por: Verónica Guilcapi 2016

En el gráfico 9-3 se aprecia los datos obtenidos así muestra en la fase de latencia una concentración de $1,22 \times 10^9$ UFC/mL a 3 días, la fase exponencial hasta el día 27, la fase estacionaria se extiende hasta los 51 días donde la concentración de esporas permanece constante y finalmente presenta la fase de muerte con un resultado final de $2,48 \times 10^9$ UFC/mL.

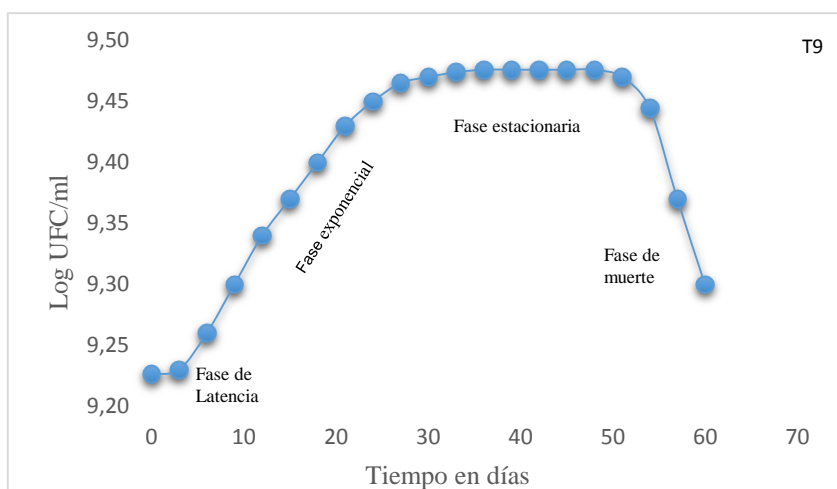


Gráfico 10-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* con plátano (*Musa paradisiaca*) a 18°C
Realizado por: Verónica Guilcapi, 2016

En el gráfico 10-3 presenta la fase de latencia hasta los 3 días con una población de $1,68 \times 10^9$ UFC/mL de formulado, la fase estacionaria se extiende hasta los 51 días donde la concentración de esporas permanece constante $3,02 \times 10^9$ UFC/mL, y finalmente presenta la fase de muerte con un resultado final de $1,65 \times 10^9$ UFC/mL.

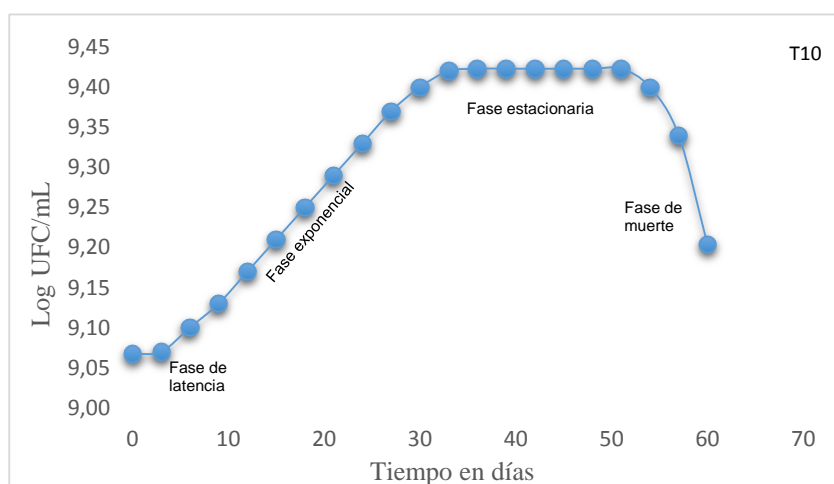


Gráfico 11-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai con arroz (*Oryza sativa*) a 18°C
Realizado por: Verónica Guilcapi 2016

La curva de crecimiento en el gráfico 11-3 muestra la fase de latencia hasta 3 días con una concentración de $1,17 \times 10^9$ UFC/mL, la fase estacionaria se extiende hasta los 48 días donde la concentración de esporas permanece constante con $2,62 \times 10^9$ UFC/mL y finalmente presenta la fase de declive o muerte obteniendo un resultado final de $1,60 \times 10^9$ UFC/mL a 60 días.

Curvas de crecimiento de los tratamientos T6, T7, T8, T9 y T10 a 18°C

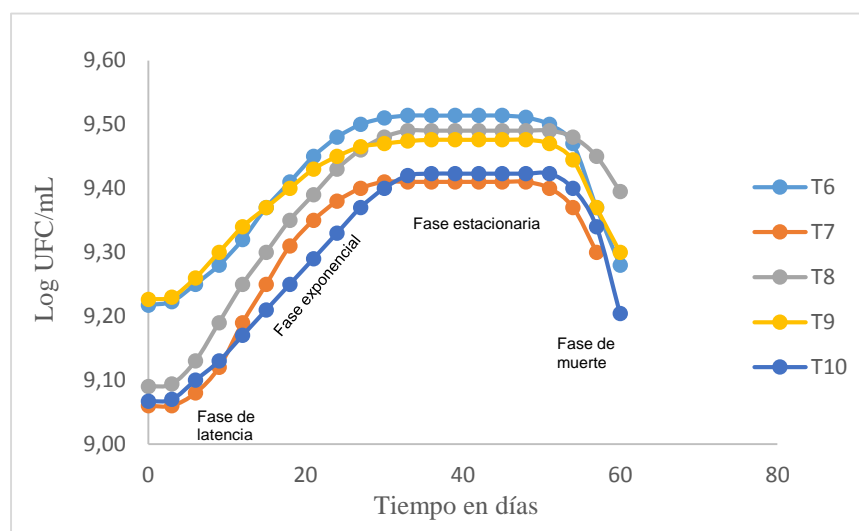


Gráfico 12-3: Curva de Crecimiento exponencial de *Trichoderma harzianum* con cada tratamiento a 18°C

T6: Harina de trigo (*Triticum vulgare*) a 18°C.

T7: Harina de cebada (*Hordeum vulgare*) a 18°C.

T8: Harina de quinua (*Chenopodium quinua*) a 18°C.

T9: Harina de plátano (*Musa paradisiaca*) a 18°C.

T10: Harina de arroz (*Oryza sativa*) a 18°C

El comportamiento de *Trichoderma harzianum* Rifai almacenada a 18°C, es óptima para el crecimiento microbiano en los tratamientos T6 trigo, T8 quinua, T9 plátano, por las condiciones de temperatura ambiente en las que se desarrolla el hongo, lo que indica que no hay variación de pH, no hay alteración en su metabolismo y en el contenido nutricional característico de los sustratos, otro factor que ayuda al desarrollo de *Trichoderma harzianum*. en los tres tratamientos mencionados es su alto contenido de carbohidratos y elementos macronutrientes que sirven para nutrir de manera eficaz al hongo. El valor de la concentración de conidios es significativa en diferencia de los tratamientos almacenados a 4°C de aproximadamente de $3,13 \times 10^9$ UFC/mL.

T7 corresponde al sustrato harina de cebada (*Hordeum vulgare*), por las características de la curva de crecimiento podemos manifestar que el desarrollo de *Trichoderma h.* en estas condiciones de nutrición y temperatura no es favorable en su esporulación, El sustrato proporciona un 80% de contenido de carbohidratos pero aporta con Calcio, micronutriente que no es suficiente para mantener viable al entomopatógeno provocando la estabilidad de los conidios en la fase estacionaria por el agotamiento de nutrientes como consecuencia se produce la muerte (Castro, 2015).

El tratamiento que tiene un declive de la curva más destacada en la fase de muerte microbiana es T10 arroz (*Oryza sativa*) que corresponde al sustrato harina de arroz; para lo cual, podemos manifestar que este tratamiento no ha sido óptimo en las 2 temperaturas ya probadas, de manera que el hongo se desarrolla de manera eficaz en sustratos que contengan altos contenidos de N, P, K, lo mencionado coincide con el ensayo del autor Serpa, (2015).

3.4.3 Curvas de crecimiento para los tratamientos a 22°C

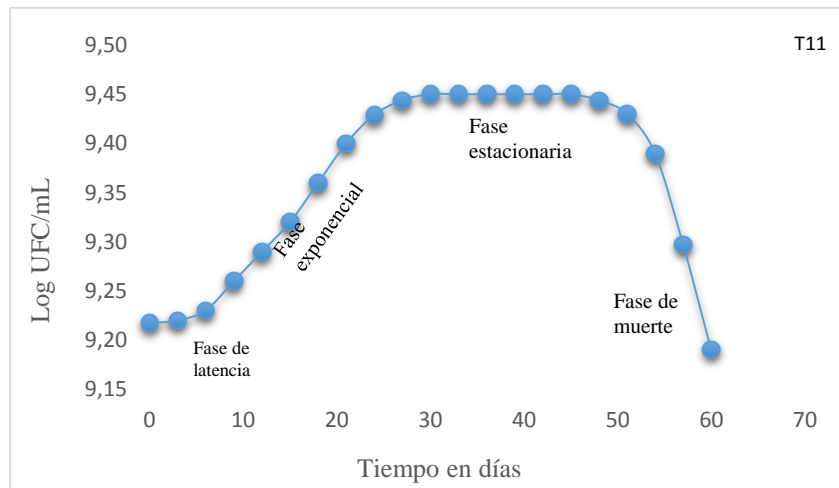


Gráfico 13-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai con trigo (*Triticum vulgare*) a 22°C

Fuente: Verónica Guilcapi, 2016

En el gráfico 13-3 presenta la fase de latencia hasta los 3 días con una población de $1,65 \times 10^9$ UFC/mL, la fase estacionaria se extiende hasta 45 días donde la concentración de esporas permanece constante con $2,80 \times 10^9$ UFC/mL, y finalmente presenta la fase de declive o muerte obteniendo un resultado final de $1,55 \times 10^9$ UFC/mL.

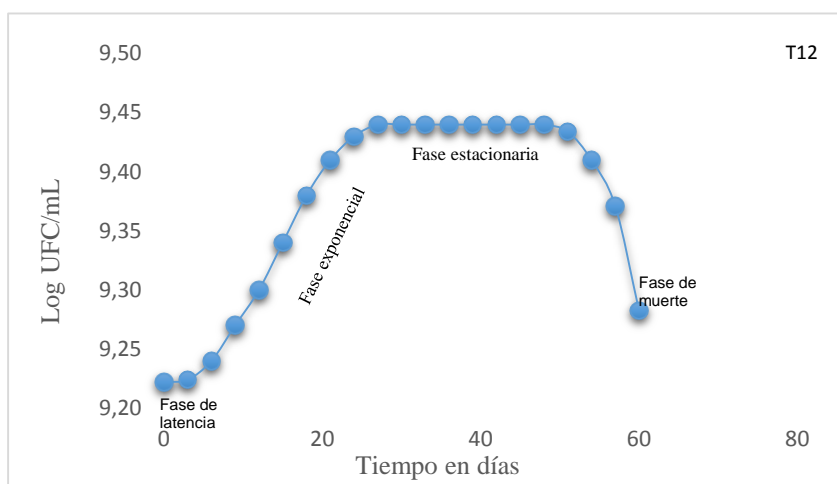


Gráfico 14-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai con cebada (*Hordeum vulgare*) 22°C
Realizado por: Verónica Guilcapi 2016

Según el gráfico 14-3, permanece 3 días la fase latente con la concentración de conidios de $1,67 \times 10^9$ UFC/mL, la fase de crecimiento dura el lapso de 48 días alcanzando una constante de $2,75 \times 10^9$ UFC/mL seguida por la fase de muerte con un resultado final de $1,92 \times 10^9$ UFC/mL.

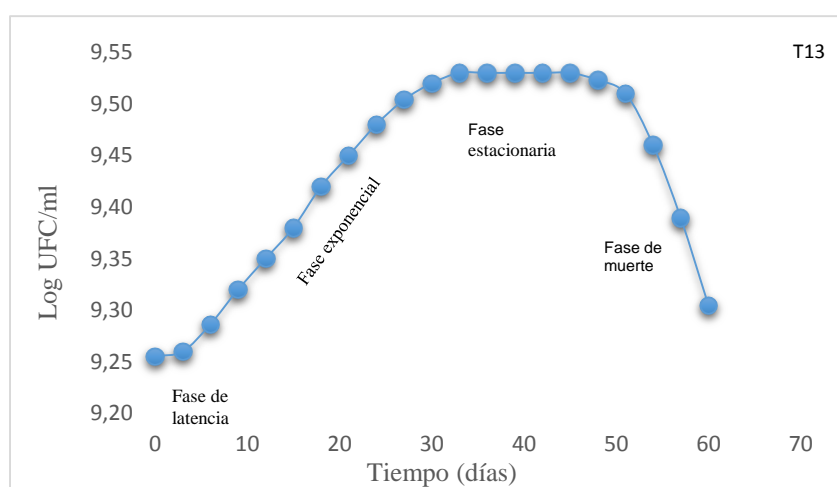


Gráfico 15-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* con quínoa (*Chenopodium quinua*) a 22°C
Realizado por: Verónica Guilcapi, 2016

En el gráfico 15-3 la curva de crecimiento presenta una latencia de 3 días con $1,80 \times 10^9$ UFC/mL en la fase estacionaria alcanza un valor constante de $3,37 \times 10^9$ UFC/mL hasta 48 días y un declive en la fase de muerte de $2,02 \times 10^9$ UFC/mL a 60 días de almacenamiento.

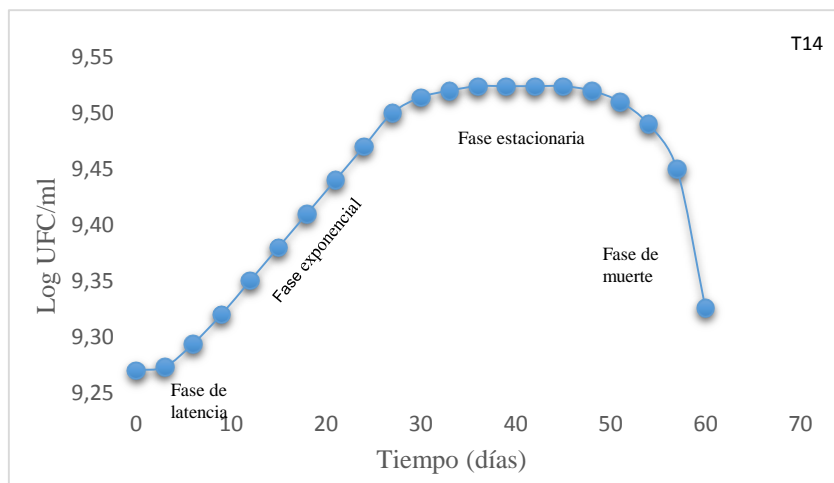


Gráfico 16-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* con plátano (*Musa paradisiaca*) a 22°C
Realizado por: Verónica Guilcapi, 2016

En la curva de crecimiento del gráfico 16-3 los conidios permanecen latentes 3 días con una concentración de $1,67 \times 10^9$ UFC/mL en la fase estacionaria alcanza un valor de $3,28 \times 10^9$ UFC/mL hasta los 48 días y finalmente presenta la fase de declive o muerte obteniendo un resultado final de $1,92 \times 10^9$ UFC/mL.

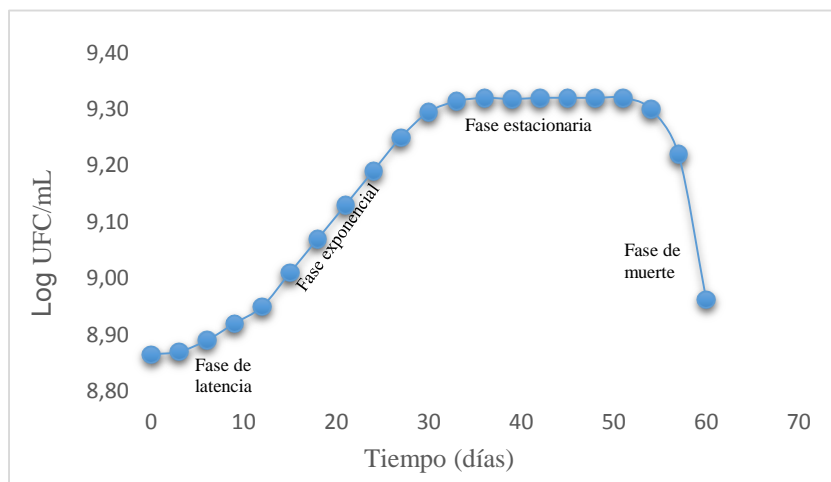


Gráfico 17-3: Curva de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai con arroz (*Oryza sativa*) a 22°C
Realizado por: Verónica Guilcapi, 2016

En el gráfico 17-3 observamos una latencia de 3 días con una concentración de esporas de $7,33 \times 10^8$ UFC/mL de formulado, continua la fase estacionaria con $2,20 \times 10^8$ UFC/mL constante hasta 33 días y un resultado final de $1,17 \times 10^8$ UFC/mL a 60 días de almacenamiento.

Curvas de crecimiento de los tratamientos T6, T7, T8, T9 y T10 a 22°C

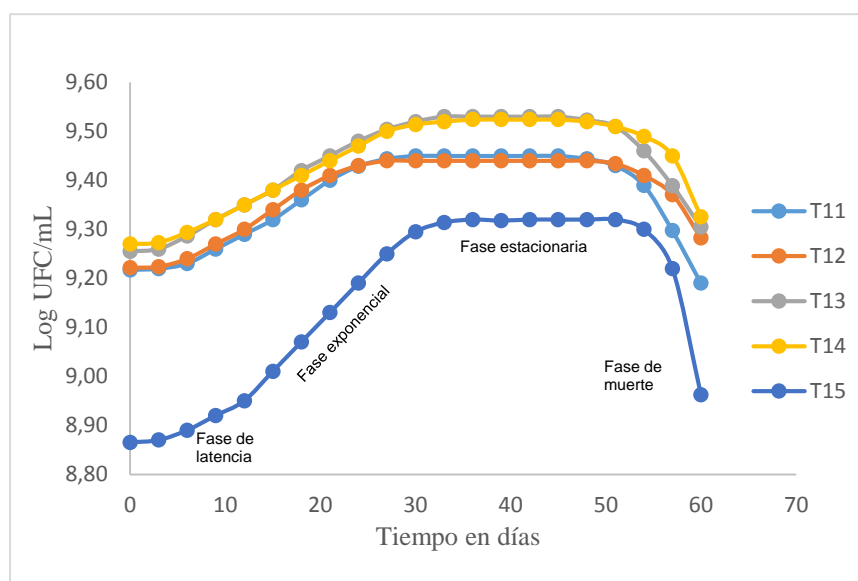


Gráfico 18-3: Curva de Crecimiento exponencial de *Trichoderma harzianum* con cada tratamiento a 22°C.

Fuente: Verónica Guilcapi

- T11: Harina de trigo (*Triticum vulgare*) a 22°C.
- T12: Harina de cebada (*Hordeum vulgare*) a 22°C.
- T13: Harina de quinua (*Chenopodium quinua*) a 22°C.
- T14: Harina de plátano (*Musa paradisiaca*) a 22°C.
- T15: Harina de arroz (*Oryza sativa*) a 22°C.

El comportamiento de *Trichoderma harzianum* Rifai frente los tratamientos T13 quinua (*Chenopodium quinua*) y T14 plátano (*Musa paradisiaca*), responde satisfactoriamente almacenado en esta temperatura los 2 tratamientos alcanzan concentraciones de esporas de $3,37 \times 10^9$, siendo un valor alto en diferencia a las temperaturas anteriores lo cual, indica que las condiciones de temperatura es favorable para el hongo *Trichoderma harzianum* porque en estos sustratos no se alteran las reacciones metabólicas debido a su alto contenido de fuente de Carbono que supera el 80% y además aportan con otros nutrientes como proteínas, azúcares por ser derivada de una fruta (T14), el sustrato T11 trigo (*Triticum vulgare*) contiene los macronutrientes primarios esenciales que se encuentran en el suelo (N, P, K) además posee Zn, Al, Mn, Ca, Mg y Cu El factor nutricional es esencial para el crecimiento microbiano en estas formulaciones. Estos resultados no concuerdan con el ensayo del autor Castro, (2005) ya que, manifiesta que el hongo *Trichoderma* se desarrolla de manera óptima en temperaturas inferiores. Las propiedades intrínsecas de los tratamientos influyen en el crecimiento del entomopatógeno estos factores se relacionan con otras condiciones físicas como temperatura, pH, radiación solar entre otras.

3.5 Viabilidad del bioformulado

3.5.1 Análisis de varianza del producto a 30 días

Tabla 3-3: Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad a los 30 días

FUENTES DE VARIACIÓN (F.d.V)	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F CALCULADO
TRATAMIENTOS	14	317.503	22.679	19.543 **
ERROR	30	34.813	1.160	
TOTAL	44	352.316		
C.V.	1.19%			
MEDIA GENERAL	90.86			

** Diferencias altamente significativas.

Realizado por: Verónica Guilcapi 2016

El Análisis de varianza para los cinco sustratos evaluados a los 30 días de y a 3 temperaturas de almacenamiento, demuestra que existen diferencias altamente significativas, con un coeficiente de variación de 1.19% y una media general de 90.86% del porcentaje de viabilidad.

Tabla 4-3: Prueba de Tukey al 5% para viabilidad a 30 días

Tratamientos	Medias (%)	Rangos
T1	94.43	A
T14	94.07	AB
T8	93.00	ABC
T13	92.87	ABC
T9	92.67	ABCD
T3	92.33	ABCD
T15	91.93	ABCDE
T12	91.73	ABCDEF
T11	91.10	BCDEF
T10	90.67	CDEF
T7	89.53	DEF
T2	88.93	EFG
T5	88.60	FG
T4	86.07	GH
T6	85.10	H

Medias seguidas de la misma letra no difieren significativamente al 5%

Al realizar la prueba de Tukey al 5%, para la determinación del porcentaje de viabilidad de 15 tratamientos almacenadas 30 días, se presentan 15 niveles de significancia, ubicándose en primer lugar en el rango A el tratamiento T1 que pertenece a la bioformulación líquida preparada con harina de trigo, almacenada a 4°C con una media del porcentaje de viabilidad de 94.43%, y el tratamiento que se ubica en el último lugar es T6 trigo almacenado a 18°C en el rango H, con una media de 85.10%.

El resultado en esta investigación indica que el producto más eficaz es T1 trigo en comparación con T6 trigo, estas formulaciones están preparadas con el mismo sustrato lo que difiere son los factores ambientales de almacenamiento como la temperatura y las reacciones metabólicas que se producen en la formulación. El resultado concuerda con lo dicho en la metodología empleada por otro autor que indica que la viabilidad o proporción de conidios vivos disminuye con el tiempo dependiendo de las condiciones en las cuales son almacenados. Obteniendo una viabilidad del 94% a 40 días de almacenamiento (Castro, 2015).

Todos los tratamientos propuestos en esta investigación son viables en 30 días, lo que difieren entre sí es el ingrediente activo, estas formulaciones presentan una viabilidad superior de entre 94.43% y 85.10%.

3.5.2 Análisis de varianza del producto a 45 días

Tabla 5-3: Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad a los 45 días

FUENTES DE VARIACIÓN (F.d.V)	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F CALCULADO
TRATAMIENTOS	14	741.748	52.982	85.824**
ERROR	30	18.520	0.617	
TOTAL	44	760.268		
C.V.				0.92%
MEDIA GENERAL				85.22

** Diferencias altamente significativas.

Realizado por: Verónica Guilcapi 2016

El Análisis de varianza para los diferentes sustratos evaluados a los 45 días de almacenamiento, demuestra que existen diferencias altamente significativas, con un coeficiente de variación de 0.92% y una media general de 85.22 %.

Tabla 6-3: Prueba de Tukey al 5% para viabilidad a 45 días

Tratamientos	Medias (%)	Rangos
T14	92.03	A
T13	89.97	AB
T11	88.97	BC
T8	88.33	BCD
T15	87.93	BCD
T12	86.60	CDE
T7	86.33	DE
T3	86.03	DE
T6	86.00	DE
T10	84.33	EF
T9	83.00	F
T2	82.77	F
T5	80.23	G
T4	77.93	G
T1	77.93	G

Medias seguidas de la misma letra no difieren significativamente al 5%

La prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de viabilidad de 15 tratamientos en 45 días después de su preparación, se presentan 9 niveles de significancia en el primer lugar ocupa T14 plátano (*Musa paradisiaca*) a 22°C en el rango A con una media del porcentaje de viabilidad de 92.03 y el tratamiento que se ubica en el último lugar es T1 Trigo (*Triticum vulgare*) en el rango H, con una media de 85.10 a 4°C.

Estos resultados son diferentes con los obtenidos en los tratamientos a 30 días de evaluación, en esta prueba se presentó porcentajes de viabilidad menores al 80% como es el caso de T4 plátano y T1 (trigo). El estándar recomendado para la manipulación de bioformulados preparados a base de hongos como agentes de biocontrol es de una viabilidad superior al 80% (Berlanga-Padilla, 2006). Por lo que se recomienda un alto número de conidios viables, las variables que influyen en el decremento de la viabilidad son las condiciones de nutrición y temperatura.

3.5.3 Análisis de varianza del producto a 60 días

Tabla 7-3: Análisis de varianza para el porcentaje de viabilidad a los 60 días

FUENTES DE VARIACIÓN (F.d.V)	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	F CALCULADO
TRATAMIENTOS	14	1012,783	73,342	21.447 **
ERROR	30	1011,193	3,373	
TOTAL	44	1113,977		
C.V.				2.27%
MEDIA GENERAL				80.89

** Diferencias altamente significativas.

Realizado por: Verónica Guilcapi 2016

El Análisis de varianza para los diferentes sustratos evaluados a los 45 días de almacenamiento, demuestra que existen diferencias altamente significativas entre tratamientos, con un coeficiente de variación de 0.92% y una media general de 85.22%.

Tabla 8-3: Prueba de Tukey al 5% para viabilidad a 60 días

Tratamientos	Medias (%)	Rangos
T14	88.60	A
T13	86.23	AB
T11	85.47	ABC
T15	85.17	ABC
T8	84.10	ABC
T12	83.20	ABC
T7	82.93	BC
T6	81.77	BCD
T3	80.93	BCDE
T2	80.33	CDEF
T9	77.23	DEFG
T1	75.53	EFG
T10	74.90	FG
T5	74.43	G
T4	72.53	G

Medias seguidas de la misma letra no difieren significativamente al 5%.

Se realizó la prueba de Tukey al 5% para los tratamientos en las tres temperaturas a 60 días de almacenamiento, en donde los resultados de este ensayo presentó 9 niveles de significancia en el

primer lugar se ubica T14 a 22°C en el rango A con una media de 88.60, en esta prueba la última posición la toma T1 en el rango H con una media de 72.53; los sustratos en este tratamiento son harina de plátano (*Musa paradisiaca*) y trigo (*Triticum vulgare*) respectivamente.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que las formulaciones presentan una viabilidad óptima entre 30 y 45 días de almacenamiento a excepción de dos tratamientos T4 plátano y T1 trigo en 45 días; comparando con la prueba realizada a los 60 días el resultado indica que hay tres tratamientos adicionales a los indicados anteriormente T9 plátano, T10 arroz (almacenados a 18°C) y T5 arroz (4°C) que no alcanzan un porcentaje de viabilidad recomendable (Berlanga, 2006).

Serpa, (2015) aplicando una metodología diferente al mismo tiempo de almacenamiento, manifiesta que el contenido de humedad superior a 40% presente en el sustrato, permite un mayor desarrollo conidial del hongo *Trichoderma harzianum* resultado que corrobora Campos *et al.* (2001) al indicar que un rango de humedad de entre 20.0% al 50.0% favorece el desarrollo de hongos del género *Trichoderma*.

Los resultados presentados en esta investigación demuestran contradicción con lo manifestado por otros autores e indican que la viabilidad de las formulaciones preparadas a base de *Trichoderma sp.* son eficientes en periodos de 6 meses a 1 año empleando otra metodología y métodos de conservación diferentes a las utilizadas en esta investigación.

Incluso autores como Santos *et al.*, 2012 manifestó que la tendencia de los productos biológicos disminuye la viabilidad en el lapso del tiempo.

El tratamiento en las tres temperaturas de almacenamiento más estable en cuanto a viabilidad es T14 plátano, por su contenido nutricional su porcentaje es 88.60% en 60 días.

3.6 Análisis Económico

Esta investigación tuvo como fin promover la utilización de formulados preparados a base de hongos entomopatógenos uno de ellos es *Trichoderma harzianum*, agente de biocontrol y preventivo para los cultivos frente al ataque de cualquier tipo de acción fúngica que altera el ecosistema impulsando al sector agrícola a utilizar pesticidas poniendo en riesgo la salud al consumir productos contaminados con productos químicos.

La producción y comercialización de bioformulados son importantes para mantener una agricultura sostenible y sustentable, además es importante recalcar que el modo de acción de *Trichoderma sp.* no perjudica la salud humana y animal lo que se puede prever es el uso

indiscriminado de agroquímicos y garantizar productos agrícolas y principalmente asequibles en el mercado agrícola.

Tabla 9-3: El análisis económico para cada tratamiento

RUBRO	T1	T2	T3	T4	T5
Material de Esterilización	10,61	10,61	10,61	10,61	10,61
Sustrato Sólido	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
Formulación líquida	0,25	0,43	0,43	0,37	0,11
Empacado del producto	2,09	2,09	2,09	2,09	2,09
Mano de obra	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
Costo final del producto \$/L	\$ 13,82	\$ 14,00	\$14,00	\$ 13,94	\$ 13,68

Realizado por: Verónica Guilcapi 2016

T1: Harina de trigo (*Triticum vulgare*)

T2: Harina de cebada (*Hordeum vulgare*)

T3: Harina de quínoa (*Chenopodium quinua*)

T4: Harina de plátano (*Musa paradisiaca*)

T5: Harina de arroz (*Oryza sativa*)

De acuerdo con el análisis de costos para la producción de bioformulados líquidos con cada uno de los sustratos, resultó ser económicamente el más eficaz T5, que corresponde a la formulación líquida preparada con sustrato de harina de arroz, seguido por T1 formulación preparada con sustrato de harina de trigo que es utilizado en la producción en la actualidad. Los tratamientos restantes no difieren entre sí, en cuanto al costo de los sustratos. Los valores se observan en la tabla 12-3.

CONCLUSIONES

- Se identificó de manera morfológica y molecular a la cepa *Trichoderma harzianum*, la misma que se encuentra codificada CCCh-p1 en el banco de cepas del Departamento de Fitopatología en la Facultad de Recursos Naturales ESPOCH.
- Se preparó las formulaciones líquidas con cinco sustratos (trigo, cebada, quinua, plátano y arroz) a base de conidios de *Trichoderma harzianum* Rifai presentes en sustrato sólido, estas formulaciones fueron ajustadas a valores de densidad de entre 0.98842 g/mL y 1.04564 g/mL y almacenadas a temperatura de 4°C, 18°C y 22°C por el lapso de 60 días para su evaluación.
- Se determinó la estabilidad de las formulaciones datos que presentaron curvas de crecimiento evidenciando cuatro fases, los tratamientos almacenados a 18°C y 22°C logran alcanzar una concentración de esporas de 10^9 UFC/mL siendo las más altas en este ensayo, el tratamiento óptimo en temperatura de 4°C es T3 correspondiente a la formulación con harina de quínoa, en temperatura de 18°C es T1 trigo y en 22°C es T14 plátano. En la fase de muerte los tratamientos T5, T10 y T15 que pertenecen a sustrato de arroz, demostraron ser menos estable porque el declive de la curva en esta fase es proporcional a la de crecimiento en las tres temperaturas el microorganismo presenta dificultad de adaptación y desarrollo en este sustrato por consecuencia del contenido energético del sustrato ya que no satisface la nutrición de los microorganismos.
- Se realizó la viabilidad del producto a través del método de microcultivo se evaluó a 30, 45 y 60 días de almacenamiento del producto demostrando ser el más viable T14 con un porcentaje de viabilidad de 88.6% a 60 días de almacenamiento, demostró ser el valor más alto en las evaluaciones y el tiempo máximo de consumo de las formulaciones son aquellos tratamientos que cumplen valores de viabilidad mayores al 80% el tratamiento menos factible es T4, porque cumple con un porcentaje de 72.06%.
- Se demostró con el análisis económico al producto que es asequible para el sector productivo porque alcanzó un valor económico de entre \$13.68 y \$14.00.

RECOMENDACIONES

- Reforzar el control de calidad del biofungicida preparado a base de hongos entomopatógenos para garantizar el producto.
- Implementar técnicas para garantizar y propagar el tiempo de vida útil del biofungicida.
- Evaluar alternativas para mantener la eficacia en la viabilidad del producto en relación al tiempo y las condiciones de temperatura.
- Proyectar el producto en el mercado a nivel regional y nacional de manera que se propague la utilización de productos agrícolas amigables con el ambiente, y preservar la salud humana con el consumo de productos libres de sustancias químicas.
- Se recomienda la utilización del sustrato harina de plátano en la preparación de los bioformulados, porque demuestra eficacia en cuanto a viabilidad en el tiempo y en las condiciones de almacenamiento.

BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO et al. “Utilización de desechos orgánicos como sustrato para la producción de un fungicida natural en la región cafetalera del municipio de Tuxtepec, Oaxaca y Zihuatanejo, Gro” Revista Latinoamericana de Recursos Naturales, vol.4, n° 2 (2010), (México) p.258

AGAMEZ et al. “Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma sp.* en sustrato de plátano e medio líquido estático”. *Agricultura sostenible* [En línea], 2010, (Colombia) 14(3), pp. 13-21. [Consulta: 11 NOVIEMBRE 2015]. ISSN. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/rt/printerFriendly/12597/14080>

AGRIOS, George. *Fitopatología. Quinta edición*, México D.F. México: Limusa, 2005, pp. 402-453.

AIMACAÑA TOLEDO, Diego Fernando. *Preparación de Bioformulados a base de Trichoderma harzianum Rifai para el control biológico de Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis var. Difformis Morelet) en banano (Musa acuminata Colla)*(Tesis).(Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Ingeniería Agronómica, Riobamba-Ecuador. 2010 pp. 37-38

ALVAREZ BURBANO, Zulma Fernanda, & TUZA MANZO, Enrique Rolando. *Elaboración dulce de pan dulce precocido enriquecido con Harina de Quinoa (Chenopodium quinua W.)* (Tesis pregrado). (Maestría) Universidad técnica del Norte Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Ibarra-Ecuador. 2009. pp. 21-29.

ANDRADE M, Claudia M. Evaluación del efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* y *trichoderma viridae* para el control de marchitez en mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en el cantón Pillaro, provincia de Tungurahua. (Tesis pregrado). (Ingeniera Agrónoma). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ingeniería Agronómica. Riobamba-Ecuador. 2012, p. 3:

BARBOZA et al. “Reducción de la germinación y muerte de plantas *Chenopodium quinua* causadas por *Rhizoctonia* y *Fusarium*”. *First report of Rhizoctonia zea*, n° 12 (2013), (Perú) pp. 7-11.

BAUTISTA et al. “Individual effects of sodium, potassium, calcium, and magnesium chloride salts on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth”. *Saccharomyces Genome Database* [En línea], 2011, (United State of America) 7(71), pp. 25-29. [Consulta: 2 noviembre 2015]. ISSN 1412-21. Disponible en: <http://www.yeastgenome.org/reference/S000127298/overview>

BISSETT, J. “A revision of the genus *Trichoderma*”. I. Sect. *Longibrachiatum* sect. n° 62 (1991), (Canadá) pp. 924-931.

BISSETT, J., SZAKACS, C.A. NOLAN, I. DRUZHININA, C. GRADINGER, and KUBICEK. New species of *Trichoderma* from Asia. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 81. Diciembre 2003, Ottawa- Canadá, pp. 570-586.

BERLANGA, P. *Efecto de hongos entomopatógenos en depredadores de pulgón de los cítricos (Homóptera: Aphididae)*. Colima-Máxico: Memorias del XXIX Congreso Nacional de Control Biológico, (2010). pp. 384-388.

CAMPOS, B., REYES, Y., INFANTE, D., GONZÁLEZ, E., BAÑOS, E., CRUZ, A. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia sp.* en arroz; *Rev. Protección Veg.* Vol. 23 2008, Cuba, pp. 56-58.

CARBALLO, M. “Formulación de hongos entomopatógenos”. *Rev. Manejo integrado de Plagas*, vol. 35, n° 4 (2010), (Cuba) pp. 1-4.

CASTRO, R. “Biotecnología en el Ecuador”. *Revista Mundo Verde*. (2005), (Ecuador), pp. 35-38.

CASTRO GÓMEZ, Rosa del Pilar. *Bioproducto a base de una cepa nativa de Trichoderma harzianum Rifai para el manejo de la Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis Morelet)* (Tesis). (Doctoral) Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara-Cuba. 2015. pp. 48-97.

CASTRO, R., PESÁNTEZ, M., ALVARADO-CAPO, Y. Efecto de una cepa nativa de *Trichoderma spp.* Como antagonista de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en casa de cultivo. *Biotecnología Vegetal*. 2014, Cuba, pp. 24-32

CHET I. et al. “*Trichoderma* .Applications , mode of action and potential as biological control agents of soilborne pathogen fungi”. *Whashington-USA: Viley Interscience*[en línea]. 2012. [Consulta: 22 septiembre 2015]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001

CRUZ MARTÍNEZ, Lina Carolina. Estandarización del Proceso de Producción Masiva del Hongo *Trichoderma harzianum* Th003 mediante Fermentación Bifásica a Escala Piloto. (Tesis pregrado). [pdf] Pontificie Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Microbiología Industrial. (Bogotá-Colombia). 2013. 46-51[Consulta: 11 octubre 2015]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>

DRUZHININA, I., KOPCHINSKIY, M., KUBICEK L. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* Vol. 3. 2010, Estados Unidos, pp. 47:55-64.

ENDARA, Maritza A. Reproducción del hongo *Trichoderma harzianum* (Biofungicida) aprovechando desechos agroindustriales (Residuos de papa, tamo de frejol, bagazo de caña). (Tesis pregrado). (Ingeniero Agroindustrial). Universidad del Norte, Facultad de ingeniería en ciencias Agropecuarias y ambientales, Escuela de Ingeniería Agroindustrial. Sangolquí-Ecuador. 2011, p. 21.

FLORES LEMA, Valeria Michelle. *Determinación del Efecto Antagónico de Cepas nativas de Trichoderma spp, frente a Mycosphaerella fijiensis en plantas de banano a nivel invernadero.* (Tesis)(Pregrado) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas. Riobamba-Ecuador. (2015). pp. 21-32

FRUTON, J. *Molecules and Life.* 2ª ed. Cleveland-Estados Unidos: Weiss B., 2011 pp. 2-5.

GARCÍA, Berni A.; “El derecho a un ambiente sano en la Constitución Ecuatoriana”. *Revista judicial, n° 42* (2013), (Ecuador) pp. 15-16

GARCÍA, Cipriano; GUTIÉRREZ, Guadalupe. “Problemática y Riesgo Ambiental por el Uso de Plaguicidas en Sinaloa. *Redalyc* [En línea], 2012, México 22(8), pp. 1-6. [Consulta: 22 octubre 2015]. ISSN 256-98. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/461/46125177005.pdf>.

GOÑI, Ismael. “Análisis de almidón resistente un método para alimentos y productos alimenticios”. *Revista de Química Alimenticia, n° 56* (2013), (España), pp.445-449.

HARMAN, GE., HOWELL, RH., VITERBO, A., CHET I., LORITO, M. *Trichoderma* species opportunistic, a virulent plant symbionts. *Nature Reviews, Microbiology*. Vol. 2. 2004pp. 43-56.

HARMAN, G. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma harzianum* phytopathology, vol.96, 2008. Estados Unidos, pp. 190-194.

HERNÁNDEZ PAGUAY, Rosa Eliana. *Determinación del número de esporas viables en función de tiempo y temperatura de TRIKOFUN, NEMAKILL, METHAKILL, BAUKILL y VERTIK en formulados líquidos.* (Tesis)(Pregrado) Escuela Superior politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador 200. pp. 65-91.

HUDSON, M. *Molecular Ecology Resources*. 8ªed. Washington-Estados Unidos: Lillium, 2010 p. 20.

INFANTE, Danay; GONZÁLEZ, Noyma; REYES, Yusimy. “Mecanismos de Acción de *trichoderma* frente a Hongos Fitopatógenos”. *Revista de Protección Vegetal*, n° 24 (2010), (Cuba) pp. 34-38.

JIMÉNEZ, M.; GALINDO, J.; RAMÍREZ, C. “Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *Difformis* mediante bacterias epifitas”. *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE)*, n° 10 (2012), (Costa Rica) pp. 105-109.

LORENZO, N. Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos efectividad y posibilidades de reproducción de las cepas nativas de *Trichoderma spp.* [En línea]. (Tesis).(Postgrado). Universidad Agraria de La Habana, Protección Vegetal. La Habana Cuba. 2012. pp. 65-73.

LORITO, M. HARMAN, G. PRIET, A. HAYES, C. “Extracellular chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum*, purification, characterization and molecular cloning”. *Phytopathology* [En línea], 1990, (Cuba) 82(10), pp. 10-77. [Consulta: 20 diciembre 2015]. 108-657. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext

LLERENA, Myriam. *Nutrición* [blog] (2015). [Consulta: 11 noviembre 2015]. Disponible en: <http://comelimpio.com/2013/03/24/nutricion-las-harinas-y-sus-propiedades/>

MONZÓN, Arnulfo. “Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua”. *Manejo integrado de plagas* [En línea], 2011, (Nicaragua) 63(6), pp. 95 – 103. [Consulta: 21 noviembre 2015]. ISSN 21-98. Disponible en: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Monzon2001HongoEntomopatogenos.pdf>

NASÓN, A. *Biología*. 2ª ed. Monterrey-México: Limusa, 2011 pp. 12-15.

PÉREZ, L. Morfología de las especies de *Mycosphaerella* asociadas a manchas de las hojas en *Musa* spp. *Redalyc*. Vol. 6. Junio 2011, Cuba, pp. 23-36.

PESÁNTEZ, M. Fichas Técnicas. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Laboratorio de Fitopatología. 2003

PLAZA, G.; UPCHURCH, R.; BRIGMON, R. “Rapid DNA extraction for Screening Soil Filamentous Fungi Using PCR Amplication. *Polish Journal of Environmental Studies*. n° 3 (2004), (tados Unidos) pp. 315-318.

POALACÍN, C.; JUANA, M. Estudio del adecuado crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma hamatum* en sustrato sólido. (Trabajo de Grado). (Ingeniera Químnica). Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería Química. Quito-Ecuador. 2015, p. 12.

RAMOS MARIÑO, Germán Vinicio. *Evaluación de cinco sustratos y aprovechamiento biotecnológico de residuos lignocelulósicos para el cultivo de Metharizium anisopliae*. (Tesis).(Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. (Riobamba-Ecuador). 2004. pp. 50-64.

RIFAI, M . A revision of the genus *Trichoderma*. *Res Mycol*. 1969; 116:1-56.

ROMERO, Omar., et al. "Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles". *Colomb. Biotecnol.* [En línea]. 2009, Colombia. 11 (2), pp. 146- [Consulta: 12 agosto 2015]. Disponible en: https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjrsaDF9uHJAhXGWx4KHeNMD4sQFgggMAA&url=http%3A%2F%2Fdialn.et.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F3105406.pdf&usg=AFQjCNEUh64y-V_z9yj11ZoJJkPDvvEr3A.

SAMUELS, G. “*Trichoderma* a review of biology and systematic of the genus”. *Mycol Res*, n° 8 (2006), (Estados Unidos) pp. 923- 935.

SÁNCHEZ, M. et al. Aislamiento y Caracterización Molecular y agronómica de *Trichoderma* spp. Nativos del norte de Tamaulipas [En línea]. (Tesis)(Maestría) Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica; Tamaulipas-México. 2009pp. 56-60. [Consulta: 2015-08-08]. Disponible en: <http://itzamna.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/8464/1/53.pdf>

SANTOS, J. “Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de los aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034” *Revista Iberoamericana de Micología*, vol.29, n°3, (2012), (Colombia) pp. 152-154

SERPA BARAHONA, María José. *Eficiencia del Crecimiento del hongo Trichoderma harzianum Rifai para la producción de bioplaguicida, aprovechando el residuo agroindustrial de cáscara de haba (Vicia faba L).*(tesis)(Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba- Ecuador. 2015. pp. 27-30

SCLÖTTERER, C. 2004. The evolution of molecular markers –just a matter of fashion *Nature Reviews*. 4ta ed. Estados Unidos, 2014, pp. 63-69.

TANZINI, Mónica.; BATISTA, Sammuell.; GALLEGOS, Monny; SHIELD, Brianna. “Compatibilidad de agentes Tensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metharizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas*[En línea], 2011, (Costa Rica) 154(3), pp. 15-18. [Consulta: 12 agosto 2015]. ISSN 1090-560

VÁSQUEZ, Gilberto.; MUÑOZ, Carlos.; CEJA, Luis. “Comparación de Métodos de Control de la Secadera de la Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch)”. *Revista Mexicana de Fitopatología* [en línea], 2011, (México) pp. 145-148.

ZAMBRANO, J. “The Prefoldin Complex Regulates Chromatin Dynamics during Transcription Elongation”. *Saccharomyces Genome Database*[En línea]. 2013 (United State of America) 2(23), pp. 10-14. [Consulta: 1 septiembre 2015]. ISSN 1003-207. Disponible en: <http://www.yeastgenome.org/reference/S000155330/overview>.

ANEXOS

Anexo A: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 4°C mediante la cámara de Neubauer en T1.

TIEMPO Días	T1 (TRIGO)			PROMEDIO	LOG
	R1	R2	R3	UFC/mL	UFC/mL
0	1,05E+09	1,20E+09	1,00E+09	1,1E+09	9,00
3	1,05E+09	1,20E+09	1,00E+09	1,1E+09	9,00
6	1,55E+09	2,10E+09	1,50E+09	1,7E+09	9,02
9	1,85E+09	2,30E+09	1,95E+09	2,0E+09	9,05
12	2,30E+09	2,10E+09	2,40E+09	2,3E+09	9,10
15	2,45E+09	2,30E+09	2,55E+09	2,4E+09	9,15
18	2,55E+09	2,75E+09	2,25E+09	2,5E+09	9,20
21	2,25E+09	2,60E+09	2,60E+09	2,5E+09	9,25
24	2,20E+09	2,65E+09	2,60E+09	2,5E+09	9,28
27	2,50E+09	2,40E+09	2,65E+09	2,5E+09	9,31
30	2,45E+09	2,40E+09	2,60E+09	2,5E+09	9,33
33	2,40E+09	2,35E+09	2,70E+09	2,5E+09	9,34
36	2,20E+09	2,65E+09	2,60E+09	2,5E+09	9,35
39	2,25E+09	2,50E+09	2,80E+09	2,5E+09	9,35
42	2,35E+09	2,40E+09	2,70E+09	2,5E+09	9,35
45	2,50E+09	2,40E+09	2,65E+09	2,5E+09	9,35
48	2,50E+09	2,50E+09	2,40E+09	2,5E+09	9,35
51	2,45E+09	2,40E+09	2,40E+09	2,4E+09	9,35
54	2,65E+09	2,00E+09	2,40E+09	2,4E+09	9,33
57	2,15E+09	2,00E+09	2,40E+09	2,2E+09	9,29
60	1,35E+09	2,00E+09	1,65E+09	1,7E+09	9,24

Anexo B: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 4°C mediante la cámara de Neubauer en T2.

TIEMPO	T2 (CEBADA)			PROMEDIO	LOG
	Días	R1	R2	R3	UFC/mL
0	7,50E+04	1,15E+09	7,00E+04	3,8E+08	9,31
3	7,10E+04	1,15E+09	7,40E+04	3,8E+08	9,32
6	8,10E+04	1,40E+09	7,20E+04	4,7E+08	9,35
9	8,50E+04	1,70E+09	7,90E+04	5,7E+08	9,36
12	8,90E+04	1,90E+09	8,50E+04	6,3E+08	9,37
15	8,70E+04	2,20E+09	8,90E+04	7,3E+08	9,38
18	8,20E+04	2,70E+09	8,60E+04	9,0E+08	9,39
21	8,90E+04	2,85E+09	8,30E+04	9,5E+08	9,41
24	9,30E+04	2,20E+09	9,50E+04	7,3E+08	9,42
27	9,30E+04	2,20E+09	9,50E+04	7,3E+08	9,43
30	9,30E+04	2,40E+09	9,60E+04	8,0E+08	9,42
33	1,01E+05	2,45E+09	1,00E+05	8,2E+08	9,43
36	9,60E+04	2,40E+09	1,09E+05	8,0E+08	9,42
39	1,06E+05	2,40E+09	1,06E+05	8,0E+08	9,41
42	1,02E+05	2,85E+09	1,04E+05	9,5E+08	9,41
45	1,03E+05	2,95E+09	1,04E+05	9,8E+08	9,39
48	1,09E+05	2,65E+09	1,09E+05	8,8E+08	9,36
51	1,09E+05	2,85E+09	1,08E+05	9,5E+08	9,35
54	1,11E+05	2,80E+09	1,12E+05	9,3E+08	9,33
57	1,10E+05	3,05E+09	1,13E+05	1,0E+09	9,29
60	7,80E+04	1,70E+09	8,10E+04	5,7E+08	9,21

Anexo C: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 4°C mediante la cámara de Neubauer en T3.

TIEMPO	T3 (QUÍNOA)			PROMEDIO	LOG
Días	R1	R2	R3	UFC/mL	UFC/mL
0	7,50E+04	1,15E+09	7,00E+04	3,8E+08	9,02
3	7,10E+04	1,15E+09	7,40E+04	3,8E+08	9,02
6	8,10E+04	1,40E+09	7,20E+04	4,7E+08	9,03
9	8,50E+04	1,70E+09	7,90E+04	5,7E+08	9,08
12	8,90E+04	1,90E+09	8,50E+04	6,3E+08	9,14
15	8,70E+04	2,20E+09	8,90E+04	7,3E+08	9,18
18	8,20E+04	2,70E+09	8,60E+04	9,0E+08	9,22
21	8,90E+04	2,85E+09	8,30E+04	9,5E+08	9,26
24	9,30E+04	2,20E+09	9,50E+04	7,3E+08	9,28
27	9,30E+04	2,20E+09	9,50E+04	7,3E+08	9,30
30	9,30E+04	2,40E+09	9,60E+04	8,0E+08	9,32
33	1,01E+05	2,45E+09	1,00E+05	8,2E+08	9,33
36	9,60E+04	2,40E+09	1,09E+05	8,0E+08	9,34
39	1,06E+05	2,40E+09	1,06E+05	8,0E+08	9,34
42	1,02E+05	2,85E+09	1,04E+05	9,5E+08	9,34
45	1,03E+05	2,95E+09	1,04E+05	9,8E+08	9,34
48	1,09E+05	2,65E+09	1,09E+05	8,8E+08	9,34
51	1,09E+05	2,85E+09	1,08E+05	9,5E+08	9,33
54	1,11E+05	2,80E+09	1,12E+05	9,3E+08	9,32
57	1,10E+05	3,05E+09	1,13E+05	1,0E+09	9,29
60	7,80E+04	1,70E+09	8,10E+04	5,7E+08	9,21

Anexo D: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 4°C mediante la cámara de Neubauer en T4.

TIEMPO	T4 (ARROZ)			PROMEDIO	LOG
	Días	R1	R2		
0	8,00E+08	6,30E+04	7,00E+08	7,2E+08	9,29
3	9,00E+08	7,60E+04	1,10E+09	8,0E+08	9,32
6	1,05E+09	6,50E+04	8,00E+08	8,7E+08	9,33
9	1,10E+09	6,90E+04	9,00E+08	9,8E+08	9,33
12	1,15E+09	7,50E+04	1,25E+09	1,2E+09	9,35
15	1,50E+09	7,70E+04	1,10E+09	1,3E+09	9,35
18	1,95E+09	8,50E+04	1,65E+09	1,5E+09	9,36
21	1,60E+09	8,20E+04	1,50E+09	1,6E+09	9,37
24	1,75E+09	8,20E+04	1,70E+09	1,7E+09	9,39
27	1,80E+09	8,70E+04	2,05E+09	1,9E+09	9,40
30	2,05E+09	8,80E+04	2,10E+09	2,0E+09	9,43
33	2,15E+09	9,00E+04	2,05E+09	2,0E+09	9,43
36	2,25E+09	9,00E+04	2,10E+09	2,1E+09	9,44
39	1,85E+09	9,50E+04	2,35E+09	2,1E+09	9,44
42	2,10E+09	9,60E+04	2,25E+09	2,2E+09	9,44
45	2,55E+09	9,30E+04	2,00E+09	2,2E+09	9,43
48	2,00E+09	9,60E+04	2,65E+09	2,2E+09	9,43
51	2,35E+09	1,02E+05	2,15E+09	2,3E+09	9,41
54	2,20E+09	1,09E+05	2,45E+09	2,3E+09	9,40
57	1,75E+09	8,40E+04	1,65E+09	1,7E+09	9,23
60	1,00E+09	7,20E+04	9,50E+08	1,0E+09	9,01

Anexo E: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 4°C mediante la cámara de Neubauer en T5.

TIEMPO	T5 (PLÁTANO)			PROMEDIO	LOG UFC/mL
	Días	R1	R2	R3	
0	8,00E+08	6,50E+08	7,50E+08	7,3E+08	8,87
3	1,20E+09	1,00E+09	9,50E+08	7,3E+08	8,88
6	1,15E+09	9,50E+08	1,40E+09	1,1E+09	8,93
9	1,20E+09	1,20E+09	1,15E+09	1,2E+09	9,02
12	1,10E+09	1,35E+09	1,40E+09	1,2E+09	9,11
15	1,40E+09	1,15E+09	1,50E+09	1,3E+09	9,17
18	1,40E+09	1,60E+09	1,35E+09	1,4E+09	9,22
21	1,30E+09	1,65E+09	1,70E+09	1,5E+09	9,25
24	1,60E+09	1,65E+09	1,70E+09	1,6E+09	9,27
27	2,20E+09	1,85E+09	1,70E+09	1,7E+09	9,28
30	2,60E+09	2,30E+09	2,55E+09	1,9E+09	9,28
33	2,45E+09	2,45E+09	2,60E+09	2,0E+09	9,29
36	2,25E+09	2,00E+09	2,10E+09	2,1E+09	9,29
39	2,25E+09	2,25E+09	1,85E+09	2,2E+09	9,29
42	2,60E+09	2,05E+09	2,00E+09	2,3E+09	9,29
45	2,60E+09	2,05E+09	2,00E+09	2,3E+09	9,29
48	2,75E+09	2,40E+09	2,25E+09	2,3E+09	9,29
51	2,75E+09	1,90E+09	2,25E+09	2,4E+09	9,28
54	2,20E+09	2,95E+09	2,45E+09	2,4E+09	9,25
57	1,75E+09	1,70E+09	1,65E+09	2,1E+09	9,19
60	9,00E+08	9,00E+08	9,50E+08	9,2E+08	8,96

Anexo F: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 18°C mediante la cámara de Neubauer en T6.

TIEMPO	T6 (TRIGO)			PROMEDIO	LOG UFC/mL
Días	R1	R2	R3	UFC/mL	
0	1,70E+09	1,50E+09	1,75E+09	1,7E+09	9,22
3	1,70E+09	1,70E+09	1,70E+09	1,7E+09	9,22
6	1,65E+09	2,00E+09	1,70E+09	1,7E+09	9,25
9	2,20E+09	2,35E+09	1,95E+09	1,8E+09	9,28
12	2,35E+09	2,15E+09	2,20E+09	1,9E+09	9,32
15	2,35E+09	2,40E+09	2,20E+09	2,0E+09	9,37
18	2,65E+09	2,45E+09	2,55E+09	2,0E+09	9,41
21	3,15E+09	3,15E+09	2,95E+09	2,1E+09	9,45
24	3,10E+09	3,25E+09	3,30E+09	2,2E+09	9,48
27	3,40E+09	3,10E+09	3,20E+09	2,2E+09	9,50
30	3,25E+09	3,40E+09	3,45E+09	2,3E+09	9,51
33	3,55E+09	3,40E+09	3,65E+09	2,5E+09	9,51
36	3,45E+09	3,55E+09	3,60E+09	2,6E+09	9,51
39	2,25E+09	2,25E+09	1,85E+09	2,7E+09	9,51
42	3,90E+09	3,10E+09	3,70E+09	2,8E+09	9,51
45	3,35E+09	3,70E+09	3,75E+09	2,9E+09	9,51
48	3,55E+09	3,60E+09	3,65E+09	3,0E+09	9,51
51	3,50E+09	3,55E+09	3,80E+09	3,1E+09	9,50
54	3,60E+09	3,70E+09	3,50E+09	3,2E+09	9,47
57	2,40E+09	1,90E+09	1,65E+09	2,0E+09	9,37
60	1,45E+09	1,65E+09	1,55E+09	1,6E+09	9,28

Anexo G: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 18°C mediante la cámara de Neubauer en T7.

TIEMPO	T7 (CEBADA)			PROMEDIO	LOG UFC/mL
Días	R1	R2	R3	UFC/mL	
0	1,05E+09	1,20E+09	1,20E+09	1,2E+09	9,06
3	1,60E+09	1,10E+09	1,25E+09	1,2E+09	9,06
6	1,15E+09	1,45E+09	1,70E+09	1,3E+09	9,08
9	1,80E+09	1,50E+09	1,40E+09	1,4E+09	9,12
12	1,65E+09	1,75E+09	1,50E+09	1,6E+09	9,19
15	1,70E+09	1,40E+09	2,00E+09	1,6E+09	9,25
18	2,05E+09	1,60E+09	1,80E+09	1,7E+09	9,31
21	1,80E+09	2,00E+09	1,95E+09	1,8E+09	9,35
24	1,90E+09	2,00E+09	1,90E+09	1,9E+09	9,38
27	1,95E+09	1,80E+09	2,10E+09	1,9E+09	9,40
30	2,15E+09	1,90E+09	2,15E+09	2,0E+09	9,41
33	2,20E+09	2,20E+09	1,90E+09	2,0E+09	9,41
36	2,40E+09	2,15E+09	2,15E+09	2,1E+09	9,41
39	2,35E+09	2,25E+09	2,45E+09	2,1E+09	9,41
42	2,40E+09	2,45E+09	2,40E+09	2,2E+09	9,41
45	2,60E+09	2,50E+09	2,35E+09	2,2E+09	9,41
48	2,60E+09	2,70E+09	2,35E+09	2,4E+09	9,41
51	2,50E+09	2,65E+09	2,65E+09	2,4E+09	9,40
54	3,45E+09	3,45E+09	3,20E+09	2,5E+09	9,37
57	2,25E+09	2,40E+09	2,15E+09	2,3E+09	9,30
60	1,25E+09	1,95E+09	1,60E+09	1,6E+09	9,20

Anexo H: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 18°C mediante la cámara de Neubauer en T8.

TIEMPO	T8 (QUÍNOA)			PROMEDIO	LOG UFC/mL
	Días	R1	R2	R3	
0	1,20E+09	1,20E+09	1,25E+09	1,2E+09	9,09
3	1,35E+09	1,60E+09	1,15E+09	1,2E+09	9,09
6	1,20E+09	1,45E+09	1,50E+09	1,4E+09	9,13
9	1,85E+09	1,65E+09	9,50E+08	1,4E+09	9,19
12	1,75E+09	1,55E+09	1,55E+09	1,5E+09	9,25
15	1,85E+09	1,95E+09	1,50E+09	1,6E+09	9,30
18	1,95E+09	2,00E+09	1,80E+09	1,8E+09	9,35
21	2,25E+09	2,00E+09	1,85E+09	1,9E+09	9,39
24	2,20E+09	2,05E+09	2,40E+09	2,0E+09	9,43
27	2,70E+09	2,45E+09	2,35E+09	2,2E+09	9,46
30	2,50E+09	2,85E+09	2,55E+09	2,3E+09	9,48
33	2,50E+09	2,35E+09	3,45E+09	2,4E+09	9,49
36	2,85E+09	2,80E+09	2,75E+09	2,5E+09	9,49
39	2,55E+09	2,75E+09	3,40E+09	2,6E+09	9,49
42	3,40E+09	2,45E+09	3,10E+09	2,8E+09	9,49
45	3,25E+09	2,90E+09	3,35E+09	2,8E+09	9,49
48	3,90E+09	3,85E+09	4,05E+09	2,9E+09	9,49
51	4,45E+09	4,15E+09	3,70E+09	3,0E+09	9,49
54	3,95E+09	4,10E+09	4,00E+09	3,2E+09	9,48
57	3,65E+09	2,35E+09	2,95E+09	3,0E+09	9,45
60	2,25E+09	2,50E+09	2,70E+09	2,5E+09	9,40

Anexo I: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 18°C mediante la cámara de Neubauer en T9.

TIEMPO	T9 (PLÁTANO)			PROMEDIO	LOG UFC/mL
Días	R1	R2	R3	UFC/mL	
0	1,60E+09	1,65E+09	1,80E+09	1,7E+09	9,23
3	2,20E+09	1,70E+09	1,40E+09	1,7E+09	9,23
6	2,30E+09	2,20E+09	1,15E+09	1,8E+09	9,26
9	1,75E+09	2,05E+09	2,05E+09	1,9E+09	9,30
12	2,55E+09	1,65E+09	1,80E+09	2,0E+09	9,34
15	1,90E+09	2,15E+09	2,05E+09	2,0E+09	9,37
18	2,15E+09	2,00E+09	2,20E+09	2,0E+09	9,40
21	2,25E+09	1,95E+09	2,20E+09	2,1E+09	9,43
24	2,30E+09	2,00E+09	2,35E+09	2,1E+09	9,45
27	2,55E+09	2,30E+09	2,05E+09	2,2E+09	9,47
30	2,45E+09	2,30E+09	2,40E+09	2,3E+09	9,47
33	2,35E+09	2,65E+09	2,50E+09	2,4E+09	9,47
36	2,35E+09	2,80E+09	2,70E+09	2,4E+09	9,48
39	2,65E+09	2,65E+09	2,70E+09	2,5E+09	9,48
42	2,90E+09	2,75E+09	2,50E+09	2,6E+09	9,48
45	2,85E+09	2,50E+09	2,85E+09	2,7E+09	9,48
48	2,80E+09	2,55E+09	3,00E+09	2,7E+09	9,48
51	2,75E+09	2,55E+09	3,35E+09	2,7E+09	9,47
54	3,00E+09	2,85E+09	2,95E+09	2,8E+09	9,44
57	1,40E+09	1,95E+09	2,25E+09	1,9E+09	9,37
60	1,85E+09	1,45E+09	1,65E+09	1,7E+09	9,30

Anexo J: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 18°C mediante la cámara de Neubauer en T10.

TIEMPO	T10 (ARROZ)			PROMEDIO	LOG UFC/mL
	Días	R1	R2	R3	
0	1,10E+09	1,25E+09	1,15E+09	1,2E+09	9,07
3	1,25E+09	1,35E+09	1,30E+09	1,2E+09	9,07
6	1,35E+09	1,65E+09	1,30E+09	1,3E+09	9,10
9	1,75E+09	1,25E+09	1,60E+09	1,4E+09	9,13
12	1,65E+09	1,70E+09	1,75E+09	1,5E+09	9,17
15	2,30E+09	1,70E+09	1,60E+09	1,7E+09	9,21
18	1,90E+09	1,90E+09	2,05E+09	1,9E+09	9,25
21	1,60E+09	2,05E+09	2,30E+09	2,0E+09	9,29
24	1,95E+09	2,10E+09	2,30E+09	2,0E+09	9,33
27	2,15E+09	2,30E+09	2,05E+09	2,1E+09	9,37
30	2,35E+09	2,20E+09	2,25E+09	2,2E+09	9,40
33	2,15E+09	2,20E+09	2,60E+09	2,3E+09	9,42
36	3,15E+09	3,25E+09	3,40E+09	2,3E+09	9,42
39	3,30E+09	3,10E+09	3,35E+09	2,3E+09	9,42
42	3,70E+09	2,95E+09	3,15E+09	2,4E+09	9,42
45	3,25E+09	3,30E+09	3,20E+09	2,5E+09	9,42
48	3,25E+09	3,30E+09	3,25E+09	2,6E+09	9,42
51	3,40E+09	3,15E+09	3,25E+09	2,6E+09	9,42
54	3,30E+09	3,25E+09	3,20E+09	2,7E+09	9,40
57	2,90E+09	2,75E+09	2,85E+09	2,8E+09	9,34
60	1,35E+09	1,65E+09	1,80E+09	1,6E+09	9,20

Anexo K: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 22°C mediante la cámara de Neubauer en T11.

TIEMPO	T11 (TRIGO)			PROMEDIO	LOG UFC/mL
Días	R1	R2	R3	UFC/mL	
0	2,10E+09	1,80E+09	1,80E+09	1,65E+09	9,22
3	1,95E+09	2,15E+09	2,10E+09	1,65E+09	9,22
6	1,70E+09	2,25E+09	2,40E+09	1,70E+09	9,23
9	2,05E+09	2,90E+09	1,65E+09	1,78E+09	9,26
12	2,15E+09	2,30E+09	2,25E+09	1,87E+09	9,29
15	2,20E+09	2,25E+09	2,40E+09	1,97E+09	9,32
18	2,25E+09	2,35E+09	2,35E+09	2,02E+09	9,36
21	2,35E+09	2,40E+09	2,40E+09	2,07E+09	9,40
24	2,70E+09	2,65E+09	2,20E+09	2,17E+09	9,43
27	2,95E+09	2,75E+09	2,40E+09	2,23E+09	9,44
30	3,25E+09	3,15E+09	2,60E+09	2,40E+09	9,45
33	3,25E+09	3,15E+09	2,60E+09	2,55E+09	9,45
36	3,25E+09	3,15E+09	2,60E+09	2,65E+09	9,45
39	3,40E+09	3,30E+09	2,75E+09	2,75E+09	9,45
42	3,35E+09	3,30E+09	2,80E+09	2,85E+09	9,45
45	3,55E+09	3,15E+09	2,80E+09	2,95E+09	9,45
48	3,25E+09	3,65E+09	2,60E+09	3,00E+09	9,44
51	3,20E+09	3,10E+09	3,10E+09	3,08E+09	9,43
54	2,80E+09	2,65E+09	2,55E+09	3,22E+09	9,39
57	2,30E+09	2,45E+09	2,10E+09	1,98E+09	9,30
60	2,20E+09	1,85E+09	2,05E+09	1,55E+09	9,19

Anexo L: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 22°C mediante la cámara de Neubauer en T12.

TIEMPO	T12 (CEBADA)			PROMEDIO	LOG UFC/mL
Días	R1	R2	R3	UFC/mL	
0	1,55E+09	1,65E+09	1,80E+09	1,67E+09	9,22
3	1,85E+09	1,90E+09	1,70E+09	1,67E+09	9,22
6	2,00E+09	1,85E+09	1,90E+09	1,82E+09	9,24
9	2,15E+09	2,40E+09	2,05E+09	1,92E+09	9,27
12	2,35E+09	2,25E+09	2,15E+09	1,98E+09	9,30
15	2,25E+09	2,50E+09	2,35E+09	2,10E+09	9,34
18	2,35E+09	2,50E+09	2,35E+09	2,15E+09	9,38
21	2,50E+09	2,55E+09	2,30E+09	2,20E+09	9,41
24	2,55E+09	2,50E+09	2,40E+09	2,25E+09	9,43
27	2,55E+09	2,50E+09	2,60E+09	2,30E+09	9,44
30	2,50E+09	2,55E+09	2,75E+09	2,35E+09	9,44
33	2,60E+09	2,70E+09	2,70E+09	2,40E+09	9,44
36	2,60E+09	2,70E+09	2,70E+09	2,45E+09	9,44
39	2,80E+09	2,80E+09	2,95E+09	2,50E+09	9,44
42	2,80E+09	2,60E+09	2,80E+09	2,55E+09	9,44
45	2,80E+09	2,95E+09	2,65E+09	2,60E+09	9,44
48	2,80E+09	2,75E+09	2,90E+09	2,65E+09	9,44
51	2,75E+09	2,75E+09	2,85E+09	2,70E+09	9,43
54	2,85E+09	2,70E+09	2,75E+09	2,82E+09	9,41
57	2,35E+09	2,60E+09	2,40E+09	2,35E+09	9,37
60	2,30E+09	1,70E+09	2,05E+09	1,92E+09	9,28

Anexo M: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 22°C mediante la cámara de Neubauer en T13.

TIEMPO	T13 (QUÍNOA)			PROMEDIO	LOG UFC/mL
	Días	R1	R2		
0	2,10E+09	1,70E+09	1,60E+09	1,80E+09	9,26
3	2,10E+09	1,85E+09	1,85E+09	1,80E+09	9,26
6	2,25E+09	1,80E+09	1,90E+09	1,93E+09	9,29
9	2,15E+09	1,85E+09	2,10E+09	1,98E+09	9,32
12	1,70E+09	2,30E+09	2,45E+09	2,03E+09	9,35
15	1,70E+09	2,30E+09	2,45E+09	2,15E+09	9,38
18	2,45E+09	2,00E+09	2,30E+09	2,25E+09	9,42
21	2,20E+09	2,35E+09	2,35E+09	2,30E+09	9,45
24	2,40E+09	2,35E+09	2,45E+09	2,40E+09	9,48
27	2,25E+09	2,35E+09	2,70E+09	2,43E+09	9,50
30	3,00E+09	2,85E+09	3,00E+09	2,57E+09	9,52
33	3,20E+09	2,70E+09	3,00E+09	2,60E+09	9,53
36	3,20E+09	2,70E+09	3,15E+09	2,63E+09	9,53
39	3,10E+09	3,05E+09	3,10E+09	2,72E+09	9,53
42	3,30E+09	3,10E+09	2,70E+09	2,78E+09	9,53
45	3,15E+09	3,25E+09	3,15E+09	2,87E+09	9,53
48	3,10E+09	3,15E+09	2,95E+09	2,85E+09	9,52
51	2,80E+09	3,25E+09	3,05E+09	2,95E+09	9,51
54	3,10E+09	3,10E+09	2,90E+09	3,02E+09	9,46
57	2,35E+09	2,60E+09	2,40E+09	2,45E+09	9,39
60	2,30E+09	1,70E+09	2,05E+09	2,02E+09	9,30

Anexo N: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 22°C mediante la cámara de Neubauer en T14.

TIEMPO	T14 (PLÁTANO)			PROMEDIO	LOG UFC/mL
	Días	R1	R2	R3	
0	1,95E+09	1,80E+09	1,85E+09	1,87E+09	9,27
3	2,05E+09	1,85E+09	2,00E+09	1,87E+09	9,27
6	2,05E+09	2,10E+09	2,15E+09	1,97E+09	9,29
9	2,15E+09	2,00E+09	2,10E+09	2,10E+09	9,32
12	2,15E+09	2,10E+09	2,15E+09	2,13E+09	9,35
15	2,05E+09	2,35E+09	2,15E+09	2,23E+09	9,38
18	2,10E+09	2,20E+09	2,45E+09	2,28E+09	9,41
21	2,60E+09	2,85E+09	2,45E+09	2,35E+09	9,44
24	2,65E+09	2,75E+09	2,70E+09	2,42E+09	9,47
27	2,90E+09	2,75E+09	2,55E+09	2,48E+09	9,50
30	2,50E+09	3,00E+09	2,75E+09	2,53E+09	9,51
33	3,25E+09	3,00E+09	2,80E+09	2,60E+09	9,52
36	3,00E+09	3,00E+09	3,10E+09	2,63E+09	9,52
39	3,20E+09	3,25E+09	3,20E+09	2,70E+09	9,52
42	3,20E+09	3,10E+09	3,15E+09	2,73E+09	9,52
45	2,85E+09	3,10E+09	3,35E+09	2,75E+09	9,52
48	2,85E+09	3,00E+09	3,35E+09	2,78E+09	9,52
51	2,85E+09	3,00E+09	3,35E+09	2,87E+09	9,51
54	3,35E+09	3,55E+09	2,95E+09	2,90E+09	9,49
57	3,05E+09	2,80E+09	2,80E+09	2,88E+09	9,45
60	1,70E+09	2,45E+09	2,20E+09	2,12E+09	9,33

Anexo O: Recuento de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai en función del tiempo a 22°C mediante la cámara de Neubauer en T15.

TIEMPO	T15 (ARROZ)			PROMEDIO UFC/mL	LOG UFC/mL
	Días	R1	R2		
0	1,60E+09	1,55E+09	1,60E+09	1,87E+09	9,27
3	1,95E+09	1,65E+09	1,95E+09	1,87E+09	9,27
6	1,75E+09	1,70E+09	1,80E+09	1,97E+09	9,29
9	1,60E+09	2,25E+09	1,75E+09	2,10E+09	9,32
12	2,00E+09	1,90E+09	1,90E+09	2,13E+09	9,35
15	1,95E+09	2,35E+09	1,90E+09	2,23E+09	9,38
18	2,15E+09	2,00E+09	2,10E+09	2,28E+09	9,41
21	2,15E+09	2,10E+09	2,15E+09	2,35E+09	9,44
24	2,05E+09	2,35E+09	2,15E+09	2,42E+09	9,47
27	2,10E+09	2,20E+09	2,45E+09	2,48E+09	9,50
30	2,30E+09	2,40E+09	2,40E+09	2,53E+09	9,51
33	2,35E+09	2,50E+09	2,30E+09	2,60E+09	9,52
36	2,30E+09	2,50E+09	2,55E+09	2,63E+09	9,52
39	2,75E+09	2,40E+09	2,30E+09	2,70E+09	9,52
42	2,75E+09	2,75E+09	2,80E+09	2,73E+09	9,52
45	2,70E+09	2,55E+09	2,85E+09	2,75E+09	9,52
48	2,70E+09	2,75E+09	2,90E+09	2,78E+09	9,52
51	3,05E+09	2,75E+09	3,00E+09	2,87E+09	9,51
54	2,85E+09	3,00E+09	3,25E+09	2,90E+09	9,49
57	2,75E+09	2,95E+09	2,80E+09	2,88E+09	9,45
60	2,95E+09	2,00E+09	1,90E+09	2,12E+09	9,33

Anexo P: Porcentaje de viabilidad del bioformulado a 30 días de almacenamiento del producto.

	PORCENTAJE DE VIABILIDAD A 30 DÍAS									
	R1			R2			R3			% PROMEDIO
	EG	ENG	%	EG	ENG	%	EG	ENG	%	
T1	460	36	92,17	440	34	92,27	480	38	92,08	92,18
T2	378	42	88,89	358	40	88,83	398	44	88,94	88,89
T3	283	23	91,87	263	21	92,02	303	21	93,07	92,32
T4	358	50	86,03	338	48	85,80	378	52	86,24	86,03
T5	193	22	88,60	173	20	88,44	223	24	89,24	88,76
T6	347	52	85,01	327	50	84,71	367	54	85,29	85,00
T7	246	26	89,43	226	24	89,38	286	28	90,21	89,67
T8	230	16	93,04	210	14	93,33	250	18	92,80	93,06
T9	216	16	92,59	194	14	92,78	236	18	92,37	92,58
T10	190	18	90,53	170	16	90,59	210	20	90,48	90,53
T11	159	14	91,19	139	12	91,37	179	16	91,06	91,21
T12	145	12	91,72	125	10	92,00	165	14	91,52	91,75
T13	239	17	92,89	219	15	93,15	259	19	92,66	92,90
T14	346	20	94,22	326	18	94,48	366	22	93,99	94,23
T15	163	13	92,02	143	11	92,31	183	15	91,80	92,05

EG: Esporas germinadas

ENG: Esporas no germinadas

Anexo Q: Porcentaje de viabilidad del bioformulado a 45 días de almacenamiento del producto.

	PORCENTAJE DE VIABILIDAD A 45 DÍAS									
	R1			R2			R3			% PROMEDIO
	EG	ENG	%	EG	ENG	%	EG	ENG	%	
T1	210	46	78,095	190	44	76,84	230	48	79,13	78,02
T2	111	19	82,883	91	17	81,32	131	21	83,97	82,72
T3	185	25	86,486	165	23	86,06	165	23	86,06	86,20
T4	184	40	78,261	164	38	76,83	204	42	79,41	78,17
T5	276	54	80,435	256	52	79,69	296	56	81,08	80,40
T6	430	60	86,05	410	58	85,85	450	62	86,22	86,04
T7	176	24	86,36	156	22	85,90	196	26	86,73	86,33
T8	198	24	87,88	178	22	87,64	228	26	88,60	88,04
T9	306	54	82,35	286	52	81,82	326	50	84,66	82,94
T10	183	29	84,15	168	27	83,93	203	31	84,73	84,27
T11	218	24	88,991	198	22	88,89	238	26	89,08	88,99
T12	126	17	86,508	106	15	85,85	146	19	86,99	86,45
T13	129	13	89,922	109	11	89,91	149	15	89,93	89,92
T14	260	21	91,923	240	19	92,08	280	23	91,79	91,93
T15	176	21	88,068	156	19	87,82	196	23	88,27	88,05

EG: Esporas germinadas

ENG: Esporas no germinadas

Anexo R: Porcentaje de viabilidad del bioformulado a 60 días de almacenamiento del producto.

	PORCENTAJE DE VIABILIDAD A 60 DÍAS									
	R1			R2			R3			% PROMEDIO
	EG		%	EG	ENG	%	G	ENG	%	
T1	185	45	75,676	165	43	73,94	205	47	77,07	75,56
T2	265	52	80,377	245	50	79,59	285	54	81,05	80,34
T3	143	27	81,119	123	25	79,67	163	29	82,21	81,00
T4	129	35	72,868	109	33	69,72	149	37	75,17	72,59
T5	234	60	74,359	214	58	72,9	254	62	75,59	74,28
	EG	ENG	%	EG	ENG	%	EG	ENG	%	
T6	147	27	81,63	127	25	80,31	167	29	82,63	81,53
T7	116	24	79,31	196	22	88,78	136	26	80,88	82,99
T8	188	30	84,04	168	28	83,33	208	32	84,62	84,00
T9	120	27	77,50	100	25	75,00	140	29	79,29	77,26
T10	237	59	75,11	217	57	73,73	257	61	76,26	75,03
	EG	ENG	%	EG	ENG	%	EG	ENG	%	
T11	254	37	85,433	234	35	85,04	274	39	85,77	85,41
T12	185	31	83,243	165	29	82,42	205	33	83,9	83,19
T13	113	15	86,726	93	13	86,02	123	17	86,18	86,31
T14	243	28	88,477	223	26	88,34	263	30	88,59	88,47
T15	135	20	85,185	115	18	84,35	155	22	85,81	85,11

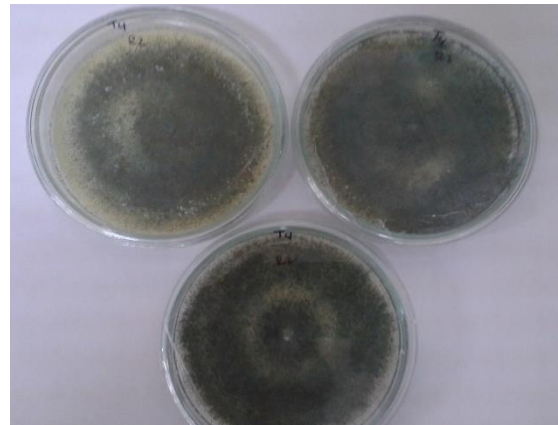
EG: Esporas germinadas
ENG: Esporas no germinadas

Anexo S: Reactivación de cepas



Reactivación de la cepa *Trichoderma harzianum* Rifai

Fuente: GUILCAPI. V, 2016.



Cepas de *Trichoderma harzianum* después de 7 días de incubación.

Fuente: GUILCAPI. V, 2016.

Anexo T: Preparación del inóculo de *Trichoderma harzianum* para la siembra en el sustrato sólido.



Siembra del inóculo en el sustrato sólido.

Fuente: GUILCAPI V., 2016.



Incubación del sustrato sólido a temperatura 27°C.

Fuente: GUILCAPI V., 2016.



Sustrato Sólido después de 8 días de incubación.

Fuente: GUILCAPI V., 2016.



Recolección del sustrato sólido

Fuente: GUILCAPI V., 2016.

Anexo U: Preparación del bioformulado con cada sustrato



Preparación de bioformulados con cada sustrato.

Fuente: GUILCAPI. V, 2016.



Cálculo de la densidad del bioformulado con cada tratamiento.

Fuente: GUILCAPI. V, 2016.



Almacenamiento de los tratamientos a 4°C, 18°C y 22°C.

Fuente: GUILCAPI. V, 2016.



Preparación de diluciones sucesivas para el conteo de esporas.

Fuente: GUILCAPI. V, 2016.

Anexo V: Diluciones sucesivas para determinar la estabilidad y viabilidad del bioformulado.



Fuente: GUILCAPI. V, 2016.



Conteo de esporas en la cámara de Neubauer.

Fuente: GUILCAPI. V, 2016.



Determinación del % de viabilidad por microcultivo.

Fuente: GUILCAPI. V, 2016.