

UNIVERSIDAD ESTATAL DE LA PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA



TEMA:

**EVALUACIÓN *ex situ* DE LA EFICACIA DE *Trichoderma* spp. PARA
BIORREMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS CON HONGOS
FITOPATÓGENOS**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR**

Previa a la obtención del Título de:
BIÓLOGA

AUTOR:

CAÑAR SILVA SAMANTHA POLETH

TUTOR/A:

BLGA. MARÍA HERMINIA CORNEJO RODRÍGUEZ, PH.D.

**LA LIBERTAD – ECUADOR
2025**

**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENINSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN *ex situ* DE LA EFICACIA DE *Trichoderma* spp. PARA
BIORREMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS CON HONGOS
FITOPATÓGENOS**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGA

Autor

SAMANTHA POLETH CAÑAR SILVA

Tutor:

BLGA. MARÍA HERMINIA CORNEJO RODRÍGUEZ, PH.D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2025

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor de Integración Curricular, “**EVALUACIÓN *ex situ* DE LA EFICACIA DE *Trichoderma* spp. PARA BIORREMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS CON HONGOS FITOPATÓGENOS**”, elaborado por **Cañar Silva Samantha Poleth** estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención de título de Biólogo/a, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

Atentamente



Blga. María Herminia Cornejo, Ph.D.
DOCENTE TUTOR
C.I. 0905260881

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular, **“EVALUACIÓN *ex situ* DE LA EFICACIA DE *Trichoderma* spp. PARA BIORREMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS CON HONGOS FITOPATÓGENOS”**, elaborado por **Cañar Silva Samantha Poleth**, estudiante de la carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del Título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente



Ac. Sonny Mendoza Lombana. Ph.D.
DOCENTE DEL ÁREA
C.I 0912802816

DEDICATORIA

A mi madre Mónica, la persona más importante para mí, que me ha apoyado y acompañado en los momentos más duros y también más felices de mi vida. Por ser mi ejemplo de lucha y fortaleza, por enseñarme a nunca rendirme y siempre recordarme que soy capaz de lograr todo lo que me proponga.

A mi padre Omar, la persona que me enseñó el valor de la responsabilidad, el respeto, la perseverancia y la honestidad, que cualquier esfuerzo trae una gran recompensa y por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi formación universitaria.

A mi pareja, Jhosua que ha sido una parte fundamental en esta etapa de mi vida, la persona que ha estado a mi lado enseñándome fortaleza sin dejarme caer, atravesando a mi lado todas las dificultades con su amor incondicional.

A mis hermanos, Omar y Nathalia por su apoyo, me han acompañado a lo largo del camino y han sido mi soporte y fuerza para salir adelante, dándome animo en los momentos difíciles.

A mis amigos, Marcos, Gabriela, Rebeca, Alex, Santiago y Luis por ser un apoyo constante en este viaje académico. Su compañía, motivación y risas han hecho de esta experiencia algo inolvidable.

Samantha Poleth Cañar Silva

AGRADECIMIENTO

A las autoridades y personal Académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por liderar el proceso de formación profesional.

De manera especial a la Blga. María Herminia Cornejo. Ph.D tutora de tesis cuya guía y apoyo han sido fundamentales por guiarme durante el desarrollo de mi trabajo de investigación.

Agradezco también a la Universidad de las Fuerzas Armadas, por cederme el permiso para el desarrollo de mi trabajo de investigación, al Dr. Darwin Rueda y la Ing. Ariana Drouet por su guía, apoyo y paciencia permitiéndome culminar esta etapa de manera exitosa.

Samantha Poleth Cañar Silva

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Cañar Silva Samantha Poleth** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 10 de Diciembre del 2024



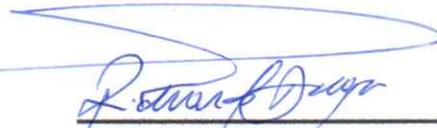
Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.
DIRECTOR/A DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ac. Sonnya Mendoza Lombana, Ph.D.
PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blga. María Herminia Cornejo, Ph.D.
DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blgo. Richard Duque Marín, Mgtr.
DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lcdo. Pascual Roca Silvestre, Mgtr.
SECRETARÍA DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

Yo, Cañar Silva Samantha Poleth, portadora de la cédula No. 1750982553, egresada de la Facultad de Ciencias del Mar, Carrera de Biología, en calidad de autora del trabajo de investigación titulado “EVALUACIÓN *ex situ* DE LA EFICACIA DE *Trichoderma* spp. PARA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HONGOS FITOPATÓGENOS”, declaro y certifico libre y voluntariamente que lo escrito en este trabajo investigativo es de mi propia autoría, a excepción de las citas bibliográficas utilizadas. Este trabajo fue realizado en colaboración con la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), y la propiedad intelectual del mismo pertenece a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Atentamente



Cañar Silva Samantha Poleth
C.I.: 175098255

INDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| DEDICATORIA | v |
| AGRADECIMIENTO..... | vi |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| GLOSARIO | 3 |
| ABREVIATURAS..... | 5 |
| CAPITULO I | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 9 |
| 3. OBJETIVOS | 11 |
| 3.1. Objetivo general..... | 11 |
| 3.2. Objetivos específicos | 11 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 11 |
| CAPÍTULO II:..... | 12 |
| 5. MARCO TEÓRICO..... | 12 |
| 5.1. Bases teóricas..... | 12 |
| 5.1.1. Introducción a la biorremediación | 12 |
| 5.1.2. Características y propiedades de <i>Trichoderma</i> spp..... | 12 |
| 5.1.3. Taxonomía..... | 13 |
| 5.1.4. Mecanismos de acción..... | 14 |
| 5.1.5. Micoparasitismo | 14 |
| 5.1.6. Antibiosis | 15 |
| 5.1.7. Competencia por espacio y nutrientes. | 15 |
| 5.1.8. Generalidades de <i>Fusarium</i> | 15 |
| 5.1.9. Generalidades de <i>Botrytis</i> | 17 |
| 5.1.10. Generalidades de <i>Bipolaris</i> | 18 |
| 5.1.11. Contaminación del suelo y su impacto | 19 |
| 5.1.12. Eficiencia de los agentes de biocontrol..... | 20 |
| 5.1.13. Importancia del suelo en la agricultura..... | 20 |
| 5.1.14. Restauración de suelos contaminados..... | 21 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| 5.2. | Antecedentes de la investigación | 22 |
| 5.2.1. | Antecedentes internacionales | 22 |
| 5.2.2. | Antecedentes nacionales | 24 |
| 5.2.3. | Impacto de la agricultura sostenible..... | 27 |
| 2.3. | Bases legales en Ecuador | 27 |
| 2.3.1. | Normativas Ambientales | 27 |
| 2.3.2. | Regulaciones sobre uso de agroquímico | 28 |
| 5.3. | Variables de estudio..... | 29 |
| CAPÍTULO III:..... | | 30 |
| 6. | MARCO METODOLÓGICO | 30 |
| 6.1. | Área de estudio | 30 |
| 6.2. | Fases del estudio | 31 |
| 6.2.1. | Fase de campo | 31 |
| 6.2.1.1. | Muestreo | 31 |
| 6.2.1.2. | Preparación e instalación de las trampas | 32 |
| 6.2.1.3. | Recuperación de trampas..... | 33 |
| 6.2.2. | Fase de laboratorio | 33 |
| 6.2.2.1. | Medios de cultivo y siembra..... | 33 |
| 6.2.2.2. | Aislamiento de microorganismos | 34 |
| 6.2.2.3. | Purificación de microorganismos | 35 |
| 6.2.2.4. | Identificación macro y microscópica..... | 35 |
| 6.2.2.5. | Obtención de cepas de <i>Trichoderma</i> | 36 |
| 6.2.2.6. | Confrontación de <i>Trichoderma</i> spp con hongos fitopatógenos..... | 36 |
| 6.2.2.7. | Porcentaje de inhibición de crecimiento radial. | 37 |
| 6.2.2.8. | Producción masiva de hongos antagonistas | 38 |
| 6.2.2.9. | Inoculación de hongo antagonista | 38 |
| 6.2.2.10. | Preparación de ensayo de suelos. | 38 |
| 6.2.2.11. | Preparación del suelo | 39 |
| 6.2.2.12. | Inoculación de suelos con patógenos | 39 |
| 6.2.2.13. | Aplicación del inóculo de <i>Trichoderma</i> spp en suelo con hongos patógenos | 40 |
| 6.2.2.14. | Tratamientos | 40 |

| | |
|---|----|
| 6.2.2.15. Evaluación de carga fitopatógena en suelos | 41 |
| 6.2.3. Análisis estadístico | 44 |
| CAPÍTULO IV | 45 |
| 7. RESULTADOS..... | 45 |
| 7.1. Aislamiento y caracterización macroscópica y microscópica de hongos patógenos. | 46 |
| 7.2. Confrontación in vitro..... | 47 |
| 7.3. Evaluación de carga fitopatógena en suelos | 56 |
| CAPITULO V | 60 |
| 8. DISCUSIONES, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 60 |
| 8.1. DISCUSIÓN..... | 60 |
| 8.2. CONCLUSIONES..... | 64 |
| 8.3. RECOMENDACIONES..... | 66 |
| 3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| 4. ANEXOS | 83 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Imagen del género de hongo <i>Trichoderma</i> spp. | 14 |
| Figura 2. Imagen del género de hongo <i>Fusarium</i> spp. | 16 |
| Figura 3. Imagen del género de hongo <i>Botrytis</i> spp. | 18 |
| Figura 4. Imagen del género de hongo <i>Bipolaris</i> spp. | 19 |
| Figura 5. Ubicación geográfica de los sitios del muestreo | 31 |
| Figura 6. Resultados del crecimiento de los patógenos en el primer ensayo..... | 48 |
| Figura 7. Crecimiento de <i>Fusarium</i> vs <i>Trichoderma</i> | 50 |
| Figura 8. Crecimiento de <i>Botrytis</i> vs <i>Trichoderma</i> | 50 |
| Figura 9. Crecimiento de <i>Bipolaris</i> vs <i>Trichoderma</i> | 51 |
| Figura 10. Crecimientos de patógenos y <i>Trichoderma</i> en el segundo ensayo. | 52 |
| Figura 11. Crecimientos de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> P2. | 53 |
| Figura 12. Crecimientos de <i>Botrytis</i> y <i>Trichoderma</i> P2 | 54 |
| Figura 13. Crecimientos de <i>Bipolaris</i> y <i>Trichoderma</i> P2..... | 54 |
| Figura 14. Porcentaje de inhibición radial (PICR) Según el tratamiento..... | 56 |
| Figura 15. Carga fitopatógena de <i>Fusarium</i> en suelos en los distintos tratamientos. 57 | |
| Figura 16. Carga fitopatógena de <i>Botrytis</i> en suelos en los distintos tratamientos ... | 58 |
| Figura 17. Carga fitopatógena de <i>Bipolaris</i> en suelos en los distintos tratamientos.. | 59 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Coordenadas del área de estudio..... | 30 |
| Tabla 2. Identificación molecular de Trichoderma mediante búsqueda en BLAST del ensamblaje de lecturas del fragmento de la región ITS. | 36 |
| Tabla 3. Detalles de los tratamientos de ensayo..... | 41 |
| Tabla 4. Resumen de análisis realizados en cada fase del estudio | 42 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo A. Modelo de trampas empleadas en la investigación. | 83 |
| Anexo B. Aislamiento de microorganismos a partir de las muestras recolectadas | 83 |
| Anexo C. Confrontación <i>in vitro</i> de Trichoderma sobre Fusarium..... | 84 |
| Anexo D. Confrontacion <i>in vitro</i> de Trichoderma sobre Botrytis | 84 |
| Anexo E. Confrontacion <i>in vitro</i> de Trichoderma sobre Bipolaris..... | 85 |
| Anexo F. Masetas etiquetadas de acuerdo al tratamiento..... | 85 |
| Anexo G. Cámaras para ensayo de suelos..... | 86 |
| Anexo H. Resultados de la prueba de normalidad de Anderson Darling primer ensayo de confrontación <i>in vitro</i> | 86 |
| Anexo I. Resultados del ANOVA de una sola vía primer ensayo..... | 86 |
| Anexo J. Resultados de la prueba de normalidad de Anderson Darling segundo ensayo..... | 87 |
| Anexo K. Resultados del ANOVA de una sola vía primer ensayo..... | 87 |
| Anexo L. Resultados de la prueba de normalidad de Anderson Darling de PICR.... | 88 |
| Anexo M. Resultados del ANOVA de una sola vía de PICR..... | 88 |
| Anexo N. Comparación de resultados de ANOVA en ensayo de PICR..... | 89 |
| Anexo O. Ficha técnica caracterización macro y microscópica de Fusarium spp..... | 89 |
| Anexo P. Ficha técnica caracterización macro y microscópica de Botrytis spp | 91 |
| Anexo Q. Ficha técnica caracterización macro y microscópica de Bipolaris spp.... | 92 |
| Anexo R. Permiso de ejecución de trabajo practico en el laboratorio de agrobiotecnología IASA I Oficio Nro. ESPE-REC-2024-0326-O... .. | 94 |

RESUMEN

La investigación, llevada a cabo entre el 7 de mayo hasta el 30 de Octubre de 2024, evaluó la eficacia de *Trichoderma* spp. en la biorremediación de suelos contaminados con hongos patógenos como *Botrytis* spp., *Bipolaris* spp. y *Fusarium* spp. El estudio se desarrolló en tres sectores de Ecuador: Sangolquí, Amaguaña y la finca Agroecuasol en Guayas, seleccionadas por su diversidad agrícola y problemas fitopatógenos específicos. Se utilizó un diseño completamente al azar con nueve tratamientos y dos repeticiones por cada uno, donde se comparó la interacción entre *Trichoderma* spp. y los patógenos en condiciones controladas. La metodología incluyó dos fases principales: campo y laboratorio. En la fase de campo, se instalaron trampas con arroz precocido en frascos de vidrio para capturar hongos patógenos seleccionando subparcelas. En laboratorio, las muestras se inocularon en medios de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar), preparado y esterilizado en autoclave a 121 °C, donde se aislaron y purificaron los hongos mediante procedimientos específicos, siguiendo protocolos establecidos. La confrontación *in vitro* se realizó colocando discos de micelio de 0,5 cm de los patógenos y de *Trichoderma* spp. en placas Petri separadas por 4 cm, incubadas a 28 °C, observándose diariamente el crecimiento de las colonias y calculando su porcentaje de inhibición radial (PICR). La producción masiva de *Trichoderma* spp. se preparó en sustrato de arroz esterilizado, donde se inocularon esporas en caldo papa-dextrosa y se incubaron para promover la esporulación. La inoculación de los suelos con los hongos patógenos y posteriormente con *Trichoderma* spp. se realizó aplicando una solución con una concentración de 1×10^6 esporas/ml, y una solución de *Trichoderma* spp. con una concentración de 1×10^7 esporas/ml evaluando la carga fitopatógena mediante diluciones seriadas y conteo de esporas en cámara de Neubauer. Los resultados demostraron que *Trichoderma* spp. inhibió significativamente el crecimiento de los patógenos, logrando reducciones de hasta un 80% en la carga fitopatógena en comparación con los controles. Los análisis estadísticos mediante ANOVA confirmaron la eficacia de los tratamientos, evidenciando que *Trichoderma* spp. es una herramienta prometedora para la biorremediación de suelos agrícolas contaminados, contribuyendo a la sostenibilidad y salud de los ecosistemas agrícolas.

Palabra clave: Biorremediación, eficacia, hongos patógenos, suelos contaminados, *Trichoderma* spp.

ABSTRACT

The research, carried out between May 7 to October 30, 2024, evaluated the efficacy of *Trichoderma* spp. in the bioremediation of soils contaminated with pathogenic fungi such as *Botrytis* spp., *Bipolaris* spp. and *Fusarium* spp. The study was carried out in three sectors of Ecuador: Sangolquí, Amaguaña and the Agroecuasol farm in Guayas, selected for their agricultural diversity and specific phytopathogenic problems. A completely randomized design was used with nine treatments and two replications for each, where the interaction between *Trichoderma* spp. and pathogens under controlled conditions was compared. The methodology included two main phases: field and laboratory. In the field phase, traps with precooked rice were installed in glass jars to capture pathogenic fungi by selecting subplots. In the laboratory, the samples were inoculated in PDA (Potato Dextrose Agar) culture media, prepared and sterilized in an autoclave at 121 °C, where the fungi were isolated and purified using specific procedures, following established protocols. *In vitro comparison* was performed by placing 0.5 cm mycelium discs of the pathogens and *Trichoderma* spp. in Petri dishes separated by 4 cm, incubated at 28 °C, observing the growth of the colonies daily and calculating their percentage of radial inhibition (PICR). Mass production of *Trichoderma* spp. was prepared in sterilized rice substrate, where spores were inoculated in potato-dextrose broth and incubated to promote sporulation. The inoculation of the soils with the pathogenic fungi and subsequently with *Trichoderma* spp. was carried out by applying a solution with a concentration of 1×10^6 spores/ml, and a solution of *Trichoderma* spp. with a concentration of 1×10^7 spores/ml, evaluating the phytopathogenic load by serial dilutions and spore count in a Neubauer chamber. The results showed that *Trichoderma* spp. significantly inhibited the growth of pathogens, achieving reductions of up to 80% in the phytopathogenic load compared to controls. Statistical analyses using ANOVA confirmed the efficacy of the treatments, showing that *Trichoderma* spp. is a promising tool for the bioremediation of contaminated agricultural soils, contributing to the sustainability and health of agricultural ecosystems.

Keyword: Bioremediation, efficacy, pathogenic fungi, contaminated soils, *Trichoderma* spp.

GLOSARIO

Biocontrol: Uso de organismos vivos, como microorganismos, para controlar plagas o enfermedades, reduciendo la dependencia de pesticidas químicos.

Biorremediación: Proceso que utiliza organismos vivos, principalmente microorganismos, para eliminar o reducir la contaminación ambiental.

Microorganismos: Seres vivos microscópicos, como bacterias, hongos, algas y protozoos, que desempeñan roles clave en los ecosistemas, incluyendo la descomposición de materia orgánica y la ciclicidad de nutrientes.

Hongos antagonistas: Hongos que inhiben el crecimiento o la actividad de otros organismos patógenos, como hongos o bacterias, y se usan en biocontrol para proteger cultivos.

Fitopatología: Ciencia que estudia las enfermedades de las plantas, sus causas, síntomas y métodos de control. Abarca el estudio de patógenos (hongos, bacterias y virus) y de factores ambientales que afectan las condiciones de salubridad de las plantas (Díaz, 2020). Esta resulta fundamental para desarrollar estrategias de manejo sostenible en la agricultura, incluido el uso de biocontroladores como *Trichoderma*.

Bioaugmentación: Técnica que implica la introducción de microorganismos específicos en un entorno para acelerar la biodegradación de contaminantes o mejorar procesos biológicos deseados, como la descomposición de materiales orgánicos.

Micotoxinas: Sustancias tóxicas producidas por ciertos hongos, que pueden contaminar alimentos y piensos, y causar efectos adversos en la salud humana y animal.

Rizosfera: Región del suelo que rodea las raíces de las plantas, donde se desarrollan interacciones complejas entre las raíces, microorganismos del suelo y otros factores bióticos y abióticos.

***In vitro*:** Término que significa "en el vidrio", y se refiere a procesos o experimentos realizados fuera de un organismo vivo, típicamente en un laboratorio utilizando microorganismos en condiciones controladas.

***Ex situ*:** Estrategia de estudio de seres vivos fuera de su hábitat natural.

Inhibición: Acción de reducir o bloquear la actividad de un organismo o proceso biológico.

Metabolitos: Sustancias químicas producidas por los organismos durante su metabolismo, que pueden tener funciones biológicas específicas.

Micoparasitismo: Relación en la que un hongo parasita a otro organismo, obteniendo nutrientes a partir de él.

Antibiosis: Interacción en la que un organismo produce sustancias que inhiben el crecimiento o matan a otro organismo, como ocurre en la producción de antibióticos.

Agroquímicos: Productos químicos utilizados en la agricultura, como pesticidas, herbicidas y fertilizantes, para mejorar la producción de cultivos y controlar plagas y enfermedades.

ABREVIATURAS

Spp: Species (especies). Se usa para referirse a varias especies dentro de un mismo género en la nomenclatura científica.

PDA: Potato Dextrose Agar (Agar de dextrosa de patata).

IASA: Instituto Agropecuario Superior Andino.

CSA: Crop Science and Agronomy (Ciencia de Cultivos y Agronomía).

Esp: Esporas.

PICR: Porcentaje de inhibición radial.

FD: Factor de Dilución.

TC: Tratamiento control.

T: Tratamiento.

ICC: Coeficiente de correlación intraclase.

TF: Trichoderma + Fusarium.

TBT: Trichoderma + Botrytis.

TBI: Trichoderma + Bipolaris.

Esp: Esporas.

g: Gramo.

ml: Mililitro.

mm: Milímetro.

cm: Centímetro.

μ l: Microlitro.

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

La biorremediación se ha convertido en una alternativa atractiva y prominente a las técnicas convencionales para el tratamiento de sustancias que contagian el entorno natural en la actualidad (Andrade *et al.*, 2023). La biorremediación se refiere principalmente a la transformación biológica de contaminantes por parte de microorganismos, plantas o sus enzimas en diferentes ambientes, como el suelo y el agua (Flathman, 1998).

La contaminación de suelos por hongos patógenos es un problema ambiental y agrícola importante porque es el causante de pérdidas significativas en la producción de cultivos y representa una amenaza para la salud humana. *Fusarium* causa marchitez vascular y podrición de raíces, bloqueando el flujo de agua y nutrientes. *Botrytis* provoca podredumbre gris, atacando hojas, flores y frutos y *Bipolaris* induce manchas foliares y tizón, debilitando el tejido vegetal y reduciendo el rendimiento.

Los factores que intervienen en la actividad microbiana, como la temperatura, el pH, la humedad, la disponibilidad de oxígeno, los nutrientes inorgánicos y el acceso al sustrato, desempeñan un papel clave en la presencia microbiana en suelos. La humedad superior al 60% y suelos mal drenados favorecen su proliferación, especialmente en condiciones anaeróbicas. Las temperaturas entre 20-30°C son óptimas para muchos hongos fitopatógenos, mientras que suelos compactos con menos del 30% de porosidad dificultan la aireación, favoreciendo la infección. Los suelos arcillosos o limosos, que retienen agua, son más propensos a patógenos, y un pH ligeramente ácido entre 5.5 y 7.0 también favorece su crecimiento (Ramos & Zúñiga, 2008).

El uso de microorganismos beneficiosos para eliminar o reducir la presencia de patógenos en el suelo es una alternativa sostenible y prometedora para la biorremediación (Andrade *et al.*, 2023). Perniola *et al.* (2024) explican que los tratamientos ambientales con hongos antagonistas han demostrado ser efectivos, económicos y confiables. Sin embargo, la bioaumentación de microorganismos potencialmente patógenos en un ambiente abierto suele no ser considerada en la mayoría de los casos (Vives, 2013).

Para que *Trichoderma spp.* sea eficiente como hongo biorremediador, el suelo debe cumplir ciertas condiciones físicas. La humedad debe mantenerse entre 40-60% y la temperatura entre 20-30°C. Es fundamental una estructura suelta y aireada, con textura franca o franco-arenosa para un buen equilibrio hídrico. El pH óptimo es de 5,5 a 7,0, y la conductividad eléctrica debe estar entre 0,5 y 2,0 dS/m, lo que asegura nutrientes suficientes sin acumulación excesiva de sales, maximizando la actividad del hongo.

Medina *et al.* (2024) señalan que los hongos patógenos del suelo, como *Fusarium spp.*, *Botrytis spp.* y *Bipolaris spp.*, causan enfermedades destructivas en las plantas y provocan daños económicos y ecológicos significativos. La investigación científica ha destacado el papel de estos patógenos en la degradación de cultivos como fresa, tomate y pimiento, etc. La evaluación de la eficacia de *Trichoderma spp.* para la biorremediación de suelos contaminados con hongos patógenos como *Fusarium spp.*, *Botrytis spp.* y *Bipolaris spp.* ha sido un área de investigación que ha cobrado interés en la comunidad científica debido a su potencial para abordar problemas de contaminación del suelo y pérdidas agrícolas significativas.

Estas enfermedades fúngicas perjudiciales afectan la salud de los cultivos y tiene un efecto adverso más amplio en el medio ambiente y la biodiversidad del suelo, específicamente al dañar su estructura y calidad. Adicionalmente, ciertos hongos patógenos son capaces

de generar micotoxinas, que ponen en peligro la cadena alimentaria y la salud humana. Frente a ello es conveniente evaluar la eficacia de *Trichoderma* spp. como agente de biorremediación para evitar la contaminación edáfica y restaurar la salud del agroecosistema.

El género de hongos filamentosos *Trichoderma* se encuentra en suelos en diversas partes del mundo, ha demostrado excelentes habilidades biológicas para controlar patógenos fúngicos (Chávez *et al.*, 2022). Estos organismos son conocidos por colonizar el suelo y competir con otros hongos, incluidos patógenos, mediante la producción de enzimas antifúngicas y antibióticos, así como la activación de respuestas de defensa en las plantas.

Los estudios de Harman *et al.* (2004) y Druzhinina *et al.* (2011), han destacado el desempeño de *Trichoderma* spp en la eliminación de patógenos del suelo y la mejora de la salud de las plantas hospederas. Otros investigadores como Cortés *et al.* (2023), han demostrado que ciertas cepas de *Trichoderma* tienen la capacidad de producir enzimas hidrolíticas y metabolitos antifúngicos que detienen el crecimiento de patógenos como *Fusarium*, *Botrytis* y *Bipolaris*. También han destacado la variedad genética de *Trichoderma* spp. y la importancia de elegir cepas específicas con características deseables.

Druzhinina *et al.* (2011) explican que seleccionar cepas de *Trichoderma* con resistencia al estrés ambiental y alta eficacia en la supresión de patógenos resulta idóneo para maximizar su utilidad en la biorremediación de suelos. En tal contexto, este trabajo de investigación evaluó la eficacia de este organismo en la biorremediación de suelos contaminados con hongos patógenos.

2. JUSTIFICACIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO-2017) ha declarado que las enfermedades de las plantas causadas por hongos causan pérdidas de rendimiento del 30% al 40%. Agrega que la plaga de *Fusarium* ha demostrado ser devastadora para cultivos como el banano y el cacao, dos productos esenciales para el Ecuador. La FAO (2017), asegura que *Fusarium oxysporum* ha generado pérdidas de hasta el 30% en la producción de banano en algunas áreas. Además, describe que el moho gris *Botrytis cinerea* afecta los cultivos de exportación como las rosas, el cual es parte importante de la economía nacional de Ecuador, causando pérdidas significativas en la calidad y cantidad de flores exportadas.

La necesidad de abordar los desafíos que enfrenta la agricultura moderna en la búsqueda de su sostenibilidad ambiental, la satisfacción de alimentos a la población y salud humana son aspectos importantes que toma en cuenta este estudio. El uso generalizado de pesticidas a pesar de su efectivo impacto en el control de plagas y enfermedades conlleva graves riesgos para el medio ambiente y la salud pública, de allí que, desde la investigación se busca alternativas más seguras y ecológicas, que permitan desmontar el empleo de agro-insumos sintéticos debido a las adversidades que representa para la biodiversidad (Hidalgo, 2017).

Estas pérdidas económicas también tienen un impacto social al disminuir los ingresos de los agricultores y afectar a las comunidades rurales que dependen de la agricultura. De igual manera, la presencia de hongos patógenos en el suelo compromete la sostenibilidad a largo plazo de la agricultura al afectar la estructura o composición de su biodiversidad microbiana. Por lo tanto, la evaluación de la eficacia de *Trichoderma* spp. en la biorremediación de suelos contaminados con estos patógenos se justifica por su capacidad para abordar esta problemática y

contribuir a la seguridad alimentaria, la economía agrícola y la sostenibilidad integral en Ecuador.

Alcances de la investigación

Con los antecedentes descritos, esta investigación sobre *Trichoderma* spp. como alternativa ecológica al uso de pesticidas químicos en cultivos podría ayudar a preservar este recurso y a fomentar prácticas agroecológicas más amigables y respetuosas con el ambiente. En ese sentido, los hallazgos y la información en este estudio podrían extrapolarse a otros contextos geográficos y campos agrícolas, promoviendo la transformación hacia una agricultura ambientalmente sostenible. Así mismo, se asume que la investigación aportará información básica idónea para la adopción de políticas agrícolas y estrategias de manejo de plagas enfocadas en mejorar la salud pública y la biodiversidad al tiempo que fortalecería la seguridad alimentaria y la economía agrícola.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar *ex situ* la eficacia de *Trichoderma* spp, para biorremediación de suelos contaminados con hongos fitopatógenos, mediante pruebas de laboratorio.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar pruebas *in vitro* con cepas de *Botrytis* spp., *Bipolaris* spp. y *Fusarium* spp., en confrontación con aislamientos de *Trichoderma* spp. en suelos contaminados.

- Verificar la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Botrytis* spp, *Bipolaris* spp. y *Fusarium* spp. mediante pruebas de confrontación *in vitro*.

- Analizar el efecto de *Trichoderma* spp. sobre la carga fitopatógena en suelos contaminados tras la aplicación del tratamiento de *Trichoderma* spp. bajo condiciones controladas de laboratorio.

4. HIPÓTESIS

La aplicación de *Trichoderma* spp. reduce la presencia de hongos fitopatógenos en suelos contaminados.

CAPÍTULO II:

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Bases teóricas

5.1.1. Introducción a la biorremediación

La biorremediación se define como el uso de organismos vivos para eliminar o neutralizar contaminantes en el medio ambiente; Aristizabal *et al.* (2022) indican que es una estrategia que ha ganado atención en el ámbito de la agricultura, particularmente por la creciente preocupación por la salud del suelo y la sostenibilidad, y aseguran que esta se manifiesta como una alternativa de enorme potencial, especialmente en ambientes salinos con el uso de bacterias, algas, hongos, y plantas halófitas, de tal manera, constituye un tratamiento complementario para lograr una gestión sostenible de suelos salinos.

Mota *et al.* (2024) aseveran que este proceso se centra en eliminar contaminantes y en restaurar la funcionalidad de los ecosistemas afectados. En el contexto agrícola, la biorremediación es decisiva para combatir los efectos perniciosos de la contaminación, mejorando la calidad del suelo y fomentando la producción sostenible de cultivos.

5.1.2. Características y propiedades de *Trichoderma spp*

Trichoderma spp. es un género de hongos que ha demostrado ser un agente eficaz en el biocontrol de patógenos agrícolas. Diversos estudios (Caulier *et al.*, 2019; González *et al.*, 2023), han indicado que estos hongos generan beneficios, particularmente al ser capaces de producir metabolitos secundarios que inhiben el

crecimiento de hongos fitopatógenos, como *Ascochyta rabiei*, causante de la rabia del garbanzo.

De acuerdo con Hernández *et al.* (2014), *Trichoderma* actúa a través de diferentes mecanismos, incluyendo la competencia por recursos, la producción de enzimas que degradan las paredes celulares de los patógenos y la inducción de mecanismos de defensa en las plantas. Estos atributos hacen de *Trichoderma* spp. una buena opción en lo que se refiere al manejo integrado de plagas y enfermedades.

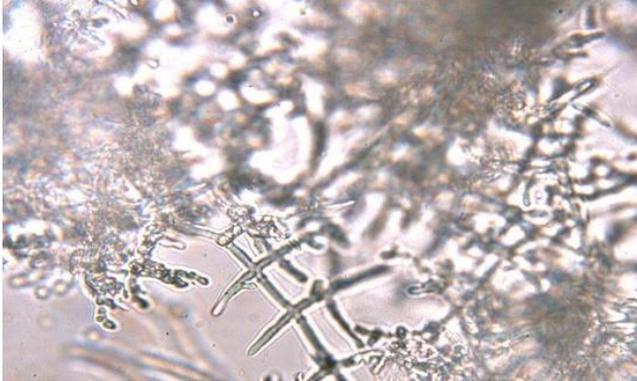
Además de su función como biocontrolador de suelos, Durand & Tello (2019) comentan que *Trichoderma* spp. actúa como bioestimulante y por tanto, promueve la sanidad del suelo y el crecimiento y desarrollo de las plantas. De igual forma, se ha documentado que la aplicación de este biocontrolador abre la posibilidad de aumentar la absorción de nutrientes, mejorar el desarrollo radicular y promover la actividad fotosintética en las plantas; mientras que Rodríguez & Vargas-Rojas (2022) evidenciaron que las plantas de tomate en suelos tratados con *Trichoderma* spp mostraron un aumento en la cantidad de hojas, longitud de raíz, y altura.

5.1.3. Taxonomía

Villegas (2005), al referirse a la taxonomía de *Trichoderma* spp. lo describe dentro del Reino Fungi, en la División Mycota y la Subdivisión Eumycota. En lo que se refiere a la clase, este autor señala que pertenece a Hyphomycetes, en el Orden Moniliales y dentro de la Familia Moniliaceae. El género es *Trichoderma* (ver figura 1).

Figura 1

Imagen del género de hongo Trichoderma spp.



5.1.4. Mecanismos de acción

Dentro de los mecanismos de acción de *Trichoderma* se han identificado diferentes tipos, que ejercen biocontrol sobre los hongos fitopatógenos, entre ellos los que mas destacan son el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia por espacio y nutrientes. (Lorenzo, 2001).

5.1.5. Micoparasitismo

El micoparasitismo se refiere a una simbiosis antagónica en la que *Trichoderma* produce enzimas como quitinasas y celulasas. En el proceso de este mecanismo de acción el antagonista crece quimiotrópicamente hacia el fitopatógeno, el cual se adhiere a las hifas del hospedante enrollándolas y degradando sus paredes celulares que termina en el debilitamiento casi en su totalidad del patógeno (Infante *et al.*, 2009).

5.1.6. Antibiosis

La antibiosis es un mecanismo de acción directa mediante la producción de metabolitos tóxicos y enzimas que ejerce un microorganismo sobre otro susceptible. Numerosas cepas de *Trichoderma* generan metabolitos secundarios, tanto volátiles como no volátiles, algunos de los cuales impiden el crecimiento de otros microorganismos sin necesidad de contacto físico. Estas sustancias inhibidoras se consideran "antibióticos" (Infante *et al.*, 2009; Nehra *et al.*, 2022).

5.1.7. Competencia por espacio y nutrientes.

La competencia es un mecanismo clave de antagonismo. Se define como la interacción desigual entre dos o más organismos que necesitan el sustrato y nutrientes, de tal forma que el uso de estos por algunos de ellos reduce su disponibilidad para los demás. Entre los tipos de antagonismo, este en específico cuenta con características propias de *Trichoderma*, también por su versatilidad sexual, su velocidad de crecimiento y su desarrollo, como por factores externos, tales como el tipo de suelo, o los factores ambientales. (Infante *et al.*, 2009).

5.1.8. Generalidades de *Fusarium*

Fusarium es un género de hongos ampliamente distribuido, capaz de afectar a plantas, animales y humanos. Las especies de este género producen toxinas, como las fumonisinas, y otras sustancias que causan diversas enfermedades en plantas. Las especies de *Fusarium* provocan graves enfermedades en estos cultivos, ya que se asocian a síntomas como la marchitez vascular y forman parte del grupo de hongos causantes de *damping-off*. Una de las alternativas más empleadas para enfrentar estas infecciones fúngicas es el uso de biocontroladores derivados de microorganismos, con el fin de reducir el uso de agroquímicos debido a su impacto negativo en el medio ambiente (Rojas *et al.*, 2017).

5.1.8.1. Taxonomía

Desde el punto de vista jerárquico taxonómico en el campo de los hongos de Fusarium, EPPO (2020a) lo describe de la siguiente forma. En el nivel más amplio, está el Reino *Fungi*, este congrega a todos los hongos. Dentro de dicho reino, Fusarium corresponde al Filo *Ascomycota*, que viene a ser una división que se caracteriza por la formación de esporas sexuales conocidas con el nombre de ascosporas.

En lo que respecta a la Clase *Sordariomycetes*, se cuentan especies de hongos frecuentemente productoras de estructuras reproductivas a modo de peritécios o asci (Ver figura 2). A lo interno de esta clase, el Orden *Hypocreales* comprende hongos mayormente saprófitos o parásitos de otros organismos. El género Fusarium se clasifica en la Familia *Nectriaceae*, incluye hongos con reconocida capacidad para formar ascosporas. El Género Fusarium, abarca una amplia gama de especies patógenas y saprófitas de importancia agrícola y ecológica.

Figura 2

Imagen del género de hongo Fusarium spp.



5.1.9. Generalidades de Botrytis

La Botrytis también conocida como podredumbre gris, prospera en climas templados (entre 10 y 25°C) y en condiciones de alta humedad, siendo los periodos de lluvia un factor importante que favorece su aparición, junto con la baja iluminación (Nature, 2022).

Es importante señalar que las esporas de este hongo aprovechan cualquier herida en la planta para ingresar y desarrollarse, germinando cuando se presentan las condiciones de humedad y poca luz mencionadas (Nature, 2022).

5.1.9.1. Taxonomía

De acuerdo a la descripción que realiza EPPO (2020b), la clasificación taxonómica de Botrytis es así, en primer lugar, se haya el Reino Fungi, el cual agrupa a todos los hongos. En este reino, Botrytis se clasifica en el Filo Ascomicetos, división que incluye hongos, que al igual que los anteriormente descritos, causan esporas sexuales. Más específicamente, corresponde al Subfilo Pezizomycotina, en el que están los ascomicetos en una compleja diversidad de estructuras reproductivas.

A nivel de lo que es la Clase, Botrytis pertenece al grupo de Leotiomicetos, hongos la mayoría de veces saprófitos, distinguibles por sus atributos reproductivos. el Orden Helotiales está dentro de este grupo, y reúne especies formadoras de apotecios, mismas que contienen esporas sexuales. Seguidamente, en la Familia Esclerotiniáceas, se hallan los hongos capaces de crear estructuras de resistencia denominadas esclerocios.

Estas les permiten sobrevivir en ambientes desfavorables. El género *Botrytis* se identifica por ser especies de valor económico, algunas de ellas responsables de patologías en cultivos. La figura 3 representa una imagen del hongo,

Figura 3

Imagen del género de hongo Botrytis spp



5.1.10. Generalidades de Bipolaris

El género *Bipolaris* abarca varios patógenos de plantas de gran relevancia con presencia mundial. Estas especies suelen estar relacionadas con problemas como manchas y tizones en las hojas, pudriciones en raíces y tallos, y otros síntomas de enfermedad, afectando especialmente a cultivos de alto valor. Las enfermedades graves causadas por distintas especies de *Bipolaris* en cultivos esenciales, como el arroz y el trigo, han sido responsables de hambrunas históricas que llevaron a la inanición de grandes poblaciones en diversas partes del mundo (Manamgoda *et al.*, 2015).

5.1.10.1. Taxonomía

La taxonómica de *Bipolaris* se organiza, según describe EPPO (2020c), comenzando por el Reino Fungi, con dos grupos de hongos. *Bipolaris* dentro del

Filo *Ascomycetos*. Este constituye, como en los dos casos que preceden, una división productora de ascosporas. A este pertenece al Subfilo Pezizomycotina, hongos con una multitud de estructuras reproductivas , como los ascos. En el siguiente nivel, la Clase Dothideomycetes reúne hongos que comúnmente presentan una estructura de reproducción sexual (asco), a menudo nocivos o saprófitos.

En esa clase, *Bipolaris* se circunscribe en la Subclase Pleosporomycetidae, un grupo ampliamente diverso en términos de morfología y ecología. El Orden Pleosporales, del cual forma parte, agrupa especies productoras de conidias. La Familia Pleosporaceae incluye hongos diversos, siendo *Bipolaris* un género representativo en este grupo. Por último, el género *Bipolaris* comprende especies con potencialidades para provocar daños en los campos de cultivo. Detalles visuales de *Bipolaris* se aprecian en la figura 4.

Figura 4

Imagen del género de hongo Bipolaris spp.



5.1.11. Contaminación del suelo y su impacto

La contaminación del suelo representa un problema de gran magnitud para la agricultura, afectando la productividad y sanidad del ecosistema. La acumulación

de pesticidas, metales pesados y la presencia de patógenos reducen sustancialmente su fertilidad y biodiversidad (Núñez, 2024). En concordancia con ello, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2020) estima que un tercio de los suelos agrícolas del mundo se encuentra degradado, lo que compromete la seguridad alimentaria global, de allí que, implementar técnicas de biorremediación es estrictamente necesario para restaurar la calidad del suelo y fomentar prácticas agrícolas sostenibles.

5.1.12. Eficiencia de los agentes de biocontrol

Los agentes de biocontrol, como *Trichoderma* spp. se valen de diversos mecanismos para ejercer su efecto positivo en las plantas. Estos incluyen la competencia por nutrientes y espacio, la producción de compuestos antifúngicos y la promoción de la resistencia en las plantas (Chávez, 2023). Su capacidad para generar enzimas líticas es fundamental para su eficacia en la reducción de poblaciones de patógenos del suelo, y es posible determinar su eficiencia en condiciones que simulan el entorno natural donde se aplicará el hongo, mediante lo cual, se tiene la oportunidad de que factores ambientales, como temperatura y humedad, afectan la interacción entre *Trichoderma* y los patógenos.

5.1.13. Importancia del suelo en la agricultura

El suelo es un recurso vital que cumple funciones numerosas en la agricultura, desde el suministro de nutrientes hasta la regulación del recurso hídrico y el secuestro de carbono. Vallejo (2013) asegura que la evaluación de la calidad del suelo es una herramienta clave para analizar la sostenibilidad de las prácticas agrícolas y ganaderas a corto, mediano y largo plazo.

Vallejo (2013) Añade que este proceso implica medir y monitorear a lo largo del tiempo las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Un indicador es una propiedad, característica o proceso que se puede medir para identificar cambios en el sistema en cuestión. Estos indicadores son fundamentales para desarrollar e implementar políticas que mejoren o conserven la calidad del suelo, ayudando a revertir y contrarrestar los procesos de degradación.

5.1.14. Restauración de suelos contaminados

La restauración de suelos alterados utilizando la biorremediación mejora la calidad del suelo y revitaliza el ecosistema. Al introducir microorganismos beneficiosos, como *Trichoderma* se ayuda a recuperar su actividad biológica, lo que a su vez mejora la productividad agrícola (Miller *et al.*, 2017).

La reparación de suelos contaminados es un proceso clave para la rehabilitación de ecosistemas degradados y la protección del ambiente. La contaminación de estos surge de diversas fuentes, entre ellas, actividades industriales, uso indiscriminado de agroquímicos vertido de sustancias químicas (Gavilánez, 2023). Para asumir este problema, se aprovechan técnicas como la biorremediación, que utiliza microorganismos que descomponen los contaminantes; y la fitoremediación para aprovechar plantas que absorber toxinas. Estas metodologías, señala López (2016), ayudan a limpiar el suelo y estimulan la recuperación de la biodiversidad y la mejora de la calidad de los cuerpos de agua subterránea.

Adicionalmente, la restauración de suelos descompuestos revitaliza áreas urbanas y las convierte en espacios verdes que benefician a las comunidades. En consecuencia, invertir en estas prácticas es apropiado para lograr un desarrollo sostenible y proteger los recursos naturales para las generaciones por venir. En este

escenario, la colaboración entre gobiernos, empresas y comunidades resulta imprescindible para implementar soluciones efectivas y duraderas.

5.2. Antecedentes de la investigación

5.2.1. Antecedentes internacionales

La eficacia de *Trichoderma* spp. en la biorremediación de suelos contaminados ha sido objeto de estudio a nivel internacional y nacional, especialmente durante los últimos años. En el contexto de otros países distintos al Ecuador, Mesa *et al.* (2019) desarrollaron en Colombia un trabajo denominado "Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas", en el que explican que varias investigaciones ponen el foco en estudiar el potencial biológico y la formulación a base de especies de *Trichoderma* con actividad inhibitoria sobre microorganismos, lo que genera que estas prácticas sean más eficaces en un amplio rango de condiciones ambientales, de especies de plagas y de sistemas de cultivos.

El trabajo de estos autores pone de relieve una visión específica sobre los reportes de los metabolitos secundarios identificados en cepas del hongo de género *Trichoderma* con aplicación biotecnológica en la generación de productos agrícolas que funcionan como biocontroladores, lo cual constituye un hecho promisorio en cuanto a nuevos descubrimientos de agentes controladores de plagas como alternativas agroecológicas en el manejo integrado de hongos, bacterias, parásitos e insectos.

Andrade *et al.* (2019) llevaron adelante un trabajo investigativo en México, tuvo como título "Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez

de chile", enfermedad con posibilidades de afectar a toda la planta y causar pérdidas importantes en el cultivo. Esta es causada por el patógeno *Phytophthora capsici*, que puede sobrevivir en el suelo por varios años e infectar a una gran variedad de plantas (Bayer, s/f). El objetivo fue evaluar el efecto antagónico de aquel hongo contra los agentes causales de marchitez en confrontaciones *in vitro* mediante cultivos duales. El estudio se efectuó durante el 2016, en la Universidad Intercultural de Estado de Puebla, Huehuetla, México.

En el marco de ese esfuerzo, se realizó la evaluación de tres aislamientos de *Trichoderma* obtenidos de rizosferas de plantas de aguacate, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*. provenientes de la raíz de plantas de chile en estado de marchitez. Para su respectiva identificación, los aislamientos se caracterizaron desde el punto de vista morfológico. Encontraron que los tres hongos antagonistas mostraron un elevado porcentaje de inhibición, *T. asperellum* el 88,2%; *T. viride* 87,2% y *T. harzianum* con 87,8%. En las condiciones del estudio, *T. asperellum*, *T. viride* y *T. harzianum*, resultaron microorganismos antagónicos eficientes contra los fitopatógenos, por lo que, recomiendan evaluaciones de biocontrol con dichos aislamientos en ambientes de invernadero y a cielo abierto.

Companioni *et al.* (2019), en su trabajo llevado a cabo en México, llamado "Trichoderma: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura", destacan que una producción sostenible de productos alimenticios sin dañar el entorno natural es un desafío que enfrenta la sociedad actual; este impone la necesidad de transformar los sistemas convencionales de aprovechamiento agrícola hacia los agroecológicos. Describen igualmente que el empleo de microorganismos para controlar plagas y patologías es una opción viable para alcanzar mayores

rendimientos y niveles de calidad de los cultivos y la mitigación de los efectos de los agroquímicos en el medio ambiente.

Morcuende (2024) adelantó una investigación en España, se identificó como: "Estudio y desarrollo de bio-inoculante basado en *Trichoderma* spp. en semilla de garbanzo de Fuentesauco (IGP) para el control efectivo de la rabia". En la primera fase se llevaron a cabo ensayos *in vitro* para caracterizar especies de *Trichoderma*, identificando como la cepa más efectiva a *Trichoderma harzianum* EN1. En la segunda fase, se hicieron evaluaciones de recubrimientos para aplicar los conidios en las semillas, encontrándose que la opción más idónea es la goma arábiga al 1%. Después se aplicó este recubrimiento a las semillas y se analizó la supervivencia de las plantas tras la infección con *Ascochyta rabiei*, hallando como resultado que las plantas tratadas presentan una mayor tasa de supervivencia.

Finalmente, hicieron un examen del efecto del recubrimiento y de *T. harzianum* en la producción de garbanzos en suelo no autoclavado y sin la presencia del patógeno, sin que se observaran diferencias significativas. Concluyen que la investigación enfatiza el potencial de *T. harzianum* como agente de biocontrol contra *A. rabiei* y su capacidad para mejorar la supervivencia de las plantas, prometiendo se una alternativa comprometedora para su uso en la agricultura sostenible.

5.2.2. Antecedentes nacionales

En el contexto del Ecuador, Ganchala (2024) llevó a efecto el trabajo: "Eficacia de *Trichoderma* spp. para en el control de nématodos fitoparásitos en el cultivo de *Alstroemeria*". Como marco de esa investigación describió que la producción de *Alstroemeria* (planta perenne de América del Sur, apreciada por sus flores

coloridas y duraderas) en Ecuador enfrenta retos importantes debido a la calidad del suelo en algunos sectores, lo que impacta tanto en la calidad como en la cantidad de los tallos. Este autor argumentó que la escasez de tallos adecuados para la exportación es un problema crítico, pues muchos de ellos no alcanzan los estándares necesarios en atributos de longitud, peso, calibre, color y tamaño de la flor.

La investigación de Ganchala (2024) se realizó en la provincia de Cotopaxi, específicamente en el cantón Latacunga, en el barrio José Guango, a una elevación de 2.860 msnm. El objetivo principal consistió en evaluar la eficacia de *Trichoderma* spp. en el control de nematodos fitoparásitos en el cultivo de *Alstroemeria*. Ganchala (2024) utilizó un diseño de bloques Completos al azar con siete tratamientos dispuestos en un arreglo factorial y tres repeticiones, comparando la aplicación de *Trichoderma* con un nematicida y un tratamiento sin aplicación.

Los resultados de la evaluación de la eficacia de *Trichoderma* spp. en el control de nematodos fitoparásitos en el cultivo de *Alstroemeria* realizada por Ganchala (2024) se sometieron a un análisis riguroso mediante técnicas estadísticas como ANOVA y pruebas post-hoc. Como resultado se obtuvo que el tratamiento con nematicida resultó el más efectivo en todas las variables evaluadas, aunque la aplicación de *Trichoderma* también mostró beneficios significativos. Por otro lado, el tratamiento sin aplicación resultó en los peores rendimientos. Estos hallazgos constituyen información relevante en relación al impacto de los tratamientos con *Trichoderma* en el desarrollo y rendimiento de *Alstroemeria*, contribuyendo a mejorar las prácticas agrícolas y optimizar el cultivo de esta especie.

Gómez & Buri (2023) hicieron una investigación cuyo título es: "*Trichoderma* spp: efectos de aplicaciones edáficas en variables agronómicas durante las fases fenológicas del cultivo de banano". El objetivo fue evaluar el efecto de *Trichoderma* spp. en plantaciones de banano, para ello hizo un experimento controlado para analizar variables agronómicas, entre ellas la emisión foliar, número de hojas, área foliar, peso del racimo y del raquis, y la calidad del fruto.

Los resultados pusieron en evidencia que la aplicación de *Trichoderma* spp tuvo un impacto positivo significativo en el crecimiento vegetativo del banano. Se observó un incremento en la emisión foliar en los primeros cuatro meses, lo que sugiere un crecimiento más vigoroso. Igualmente, se registraron mejoras en el área y número de hojas a la parición en comparación con el control. En términos de productividad, los tratamientos con *Trichoderma* spp. produjeron a un aumento significativo en el peso del racimo y del raquis, así como en la calidad del fruto, que presentó mayor uniformidad y tamaño.

Otro resultado de interés fue la reducción en los tiempos de desarrollo de la planta, reduciendo las semanas a la parición y a la cosecha, lo que permite un aprovechamiento más temprano y un ingreso más rápido. Así mismo, se apreció una mejora en el Ratio, que mide la eficiencia en la transformación del fruto en producto final, indicando que *Trichoderma* spp. Es capaz de optimizar el proceso de producción y acrecentar la rentabilidad.

Estos antecedentes constituyen un marco contextual para la investigación sobre la evaluación *ex situ* de la eficacia de *Trichoderma* spp. en la biorremediación de suelos contaminados con hongos patógenos, destacando la relevancia y aplicabilidad de este hongo en el contexto agrícola ecuatoriano.

5.2.3. Impacto de la agricultura sostenible

La agricultura sostenible es un modelo que persigue el incremento de la producción de alimentos mientras se minimizan los impactos negativos en el medio ambiente. La integración de prácticas como la biorremediación y el uso de *Trichoderma* spp. contribuyen a la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. Según Altieri y Nicholls (2018), la implementación de estrategias sostenibles aumenta la resiliencia de los sistemas agrícolas ante el cambio climático y otras presiones ambientales.

Altieri *et al.* (2015) destacan que aun en presencia de la creciente conciencia y preocupación sobre la crisis planetaria que supone el cambio climático, las emisiones de carbono continúan en aumento y no se vislumbran soluciones inmediatas y efectivas para detener el calentamiento global. Altieri y Nicholls (2018) y Altieri y Nicholls (2013), defienden que una parte del problema radica en que se necesita un cambio radical que desafía el crecimiento económico y la dominación política y económica que sostiene el sistema capitalista actual. En este contexto, la agricultura industrial basada en monocultivos, fundamental en este sistema, intenta perpetuarse mediante enfoques como la Agricultura Climáticamente Inteligente (CSA), que no cuestiona la estructura del monocultivo ni las relaciones de poder que lo sustentan.

2.3. Bases legales en Ecuador

2.3.1. Normativas Ambientales

Ecuador dispone de un marco jurídico que regula y respalda la biorremediación y el uso de biotecnologías en la agricultura. La Constitución Nacional del Ecuador (2008), en su artículo 14, establece el derecho a un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, lo que exige la adopción de prácticas que minimicen el impacto ambiental de las actividades agrícolas. Esta disposición deja claro la

importancia de la investigación y la implementación de métodos que contribuyan a la restauración de los ecosistemas.

Del mismo modo, el artículo 276 de la carta magna, señala que el Régimen de Desarrollo del país tendrá entre sus objetivos: Recuperar y conservar la naturaleza y mantener un ambiente sano y sustentable que garantice a las personas y colectividades el acceso equitativo, permanente y de calidad al agua, aire y suelo, y a los beneficios de los recursos del subsuelo y del patrimonio natural.

Por su parte, el artículo 409 constitucional señala que es de interés público y prioridad nacional conservar los suelos, en especial su capa fértil, para lo cual, se establecerá un marco normativo que procure su protección y uso sustentable que evite su degradación, principalmente aquella que se produce por la contaminación, la desertificación y la erosión. Agrega este artículo que en espacios afectados por la degradación y desertificación, el Estado tiene la obligación de realizar y promover proyectos de restauración.

2.3.2. Regulaciones sobre uso de agroquímico

La Ley de Sanidad agropecuaria (2012) y el Código Orgánico del Ambiente (2017) establecen normas para regular el uso de agroquímicos, promoviendo prácticas agrícolas sostenibles. Estas regulaciones promueven la investigación y el desarrollo de alternativas biológicas, como el uso de *Trichoderma* spp, pues contribuye al control de plagas y enfermedades, y son compatibles con los principios de sostenibilidad. El cumplimiento de estas normativas prioritario para garantizar que las prácticas agrícolas respeten la salud pública y los sistemas ecológicos.

Todo lo referido enfatiza en el valor de *Trichoderma* spp. en la biorremediación de suelos contaminados. Al asumir este problema desde el punto de vista científico y jurídico, se persigue encontrar una solución sostenible que beneficie a la producción agrícola y al medio ambiente. Entre tanto, la capacidad de *Trichoderma* para actuar como biocontrolador y bioestimulante, combinada con el marco legal en Ecuador, crea un contexto favorable para la implementación de prácticas agrícolas innovadoras.

5.3. Variables de estudio

Variable independiente:

Aplicación de *Trichoderma* spp. (tratamiento realizado en los suelos contaminados).

Variable dependiente:

Presencia de hongos fitopatógenos en los suelos contaminados (medida de la reducción o cambio en la cantidad de hongos patógenos tras el tratamiento)

CAPÍTULO III:

6. MARCO METODOLÓGICO

6.1. Área de estudio

El área de estudio corresponde a tres sectores localizados en diferentes lugares de Ecuador; Las coordenadas de estos se describen en la tabla 1.

Tabla 1

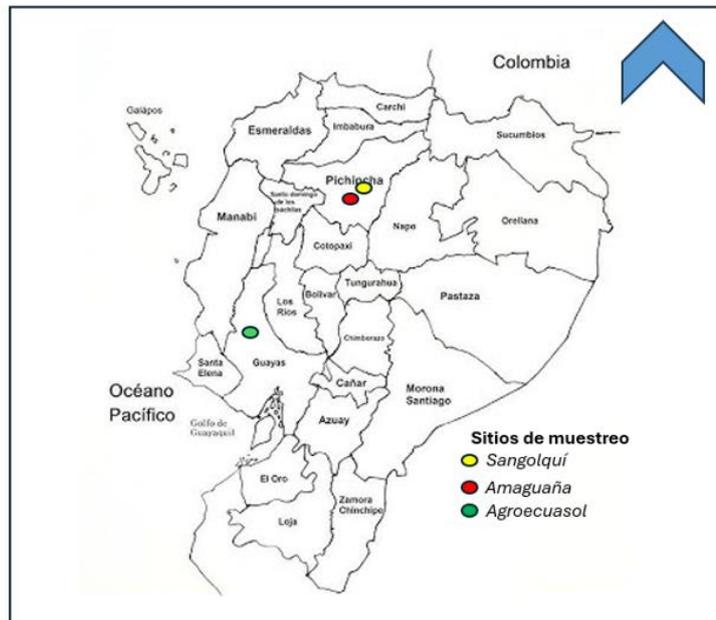
Coordenadas del área de estudio

| Sector | Latitud | Longitud |
|---|----------------|-----------------|
| Sangolquí | 0°21'20.7''S | 78°27'18.3''W |
| Amaguaña | 0°22'45.0''S | 78°29'41.0''W |
| Finca Agroecuasol (Guayas) | 2°16'16.3''S | 80°07'54.2''W |

El primero está situado en Sangolquí y tuvo como propósito obtener cepas de *Botrytis*; el segundo en Amaguaña para recolectar cepas de *Fusarium*, y el tercero en la finca Agroecuasol en Guayas para capturar cepas de *Bipolaris*. La ubicación exacta de cada uno de esos tres sitios se observa en la figura 5.

Figura 5.

Ubicación geográfica de los sitios del muestreo



Para desarrollar la investigación se cumplieron fases de campo y de laboratorio cumpliendo los protocolos específicos que se describen a continuación.

6.2. Fases del estudio

6.2.1. Fase de campo

6.2.1.1. Muestreo

Se realizó un muestreo de hongos a partir de trampas de arroz para análisis en los tres sectores ya señalados, los cuales presentaban problemas asociados con los patógenos de interés para este estudio. Primero, se identificaron los sectores considerando factores como el uso del suelo, la vegetación presente y posibles fuentes de contaminación. Con esta información, se elaboró un plan de muestreo

que estableció el número de trampas a utilizar, el tamaño de cada una y la profundidad a la que se tomó (Ministerio del Ambiente Perú., 2013).

El primer punto de muestreo se ubicó en la zona de Sangolquí, dentro de un invernadero de tomate que abarcaba un área total de 100 m², donde las plantas presentaban síntomas asociados a *Botrytis*. Este espacio se dividió en tres subparcelas, seleccionadas cerca de plantas con signos visibles de la enfermedad.

El segundo punto se localizó en Amaguaña, en un invernadero de pimiento con un área de 200 m², donde se observaron síntomas característicos de fusariosis. Al igual que en el primer sitio, esta área se subdividió en tres subparcelas. Finalmente, el tercer punto se situó en la Finca Agroecuasol, en Guayas, que cuenta con una extensión total de 20 hectáreas. Para el estudio, se delimitó un área de 1 hectárea, la cual se subdividió en tres subparcelas cercanas a plantas afectadas por *Bipolaris*. En el laboratorio, las muestras se sometieron a los análisis microbiológicos siguiendo el procedimiento metodológico propuesto por Paul & Frey (2023).

6.2.1.2. Preparación e instalación de las trampas

Se elaboraron nueve (9) trampas, tres (3) por cada punto de muestreo; las mismas se elaboraron a partir de bolsas de arroz que tuvieron una cocción de aproximadamente 10 minutos, las cuales fueron esterilizadas en autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Posteriormente se colocó 50 gr de arroz precocido dentro de frascos de vidrio de 200ml previamente esterilizados y se sellaron con una doble

capa de tela de nylon y se aseguraron herméticamente con una liga. En el anexo A se observa un modelo de dichas trampas.

Se transportaron las trampas en cada una de las áreas de estudio y se instalaron en las subparcelas que se clasificaron anteriormente a una separación de 4 metros entre una y otra, las mismas fueron instaladas en su totalidad durante día y hora específica para cada sector, entre las 8:00 y 10:00 horas. Se excavaron hoyos de 20 cm de profundidad en el suelo para enterrar los frascos, que se colocaron boca abajo y se cubrieron con hojas secas. Este procedimiento se mantuvo durante un período de incubación de 7 días consecutivos.

6.2.1.3. Recuperación de trampas

Transcurrido el tiempo de espera, se recolectaron las trampas cuidadosamente para evitar movimientos bruscos que pudieran alterar el contenido o el crecimiento de los hongos; luego fueron llevadas al Laboratorio de Agrobiotecnología de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I para su análisis e identificación.

6.2.2. Fase de laboratorio

6.2.2.1. Medios de cultivo y siembra

En el Laboratorio de Agrobiotecnología de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I, siguiendo los procedimientos aplicados por Zubieta et al. (2022), se utilizó agar PDA (Potato Dextrose Agar), un medio de cultivo ampliamente reconocido por

su eficacia en el crecimiento de hongos (Arana et al., 2014). Este medio está compuesto principalmente por extracto de papa, dextrosa y agar-agar.

La preparación del agar PDA inició con la mezcla de 39 g de medio por cada litro de agua destilada según el número de cajas Petri requeridas. El volumen de agua destilada se transfirió a frascos con tapa rosca, donde se disolvió el medio de cultivo utilizando un microondas. Posteriormente, el medio se esterilizó en autoclave (Terán, 2024).

Una vez que la temperatura del medio alcanzó los 50°C, se colocó en una cámara de flujo laminar junto con las cajas Petri previamente esterilizadas, adicionalmente se añadió 1 mL de antibiótico (Amoxicilina a 1 mg/) por cada 100 ml de medio. Posteriormente, se distribuyó 25 mL de medio de cultivo en cada una de las cajas Petri (Terán, 2024).

6.2.2.2. Aislamiento de microorganismos

El aislamiento de fitopatógenos se realizó en una cámara de flujo laminar. Se inspeccionaron las muestras recolectadas y, utilizando pinzas flameadas con etanol, se tomó un pequeño fragmento del material con características de contaminación por hongos como los granos de arroz con colores distintivos de los patógenos, y se inoculó en la superficie del agar PDA utilizando un asa de siembra estéril. Las placas se incubaron a una temperatura controlada de 28°C, permitiendo que los hongos crecieran y se desarrollaran por un periodo de cinco (5) días. A lo largo de

este proceso, se monitorizaron diariamente las placas para observar la morfología y el crecimiento de las colonias fúngicas (Hidalgo & Tello, 2022).

6.2.2.3. Purificación de microorganismos

Los hongos fueron observados al microscopio y se identificaron morfológicamente aquellos que presentaban las características de interés. Tras la identificación, se cortó un segmento de aproximadamente 5 x 5 mm del medio de cultivo donde se encontraba micelio libre de contaminación. Este segmento se inoculó en una nueva caja de Petri con medio de cultivo, incubándose en oscuridad a 28°C durante siete (7) días (Hidalgo & Tello, 2022).

6.2.2.4. Identificación macro y microscópica

Al término del período de incubación, se observaron las características macroscópicas de las colonias en el anverso del medio de cultivo. Se describieron aspectos relevantes como: coloración del centro, del medio circundante y del borde de la colonia, textura y consistencia del micelio, apariencia general de la colonia, altura alcanzada por el micelio, patrón de crecimiento según la densidad visible del micelio y presencia o ausencia de esporulación. Estas características fueron representadas en fichas técnicas para su mejor comprensión (Ver anexos O, P Y Q) (Terán, 2024).

Para la caracterización microscópica de las cepas aisladas de hongos, se empleó una metodología que consistió en extraer con un asa de siembra una parte de micelio puro de las placas de cultivo. Se colocó una gota de agua destilada sobre un

portaobjetos, procurando evitar la formación de burbujas. La muestra fue observada bajo el objetivo de 40x, registrando tanto las características morfológicas del micelio como las estructuras reproductivas presentes. La identificación de los posibles géneros de hongos se basó en las características microscópicas observadas, contrastándolas con la información bibliográfica disponible.

6.2.2.5. Obtención de cepas de *Trichoderma*.

Las cepas de *Trichoderma* utilizadas en este estudio fueron suministradas por el Laboratorio de Agrobiotecnología de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA. Dichas cepas fueron previamente identificadas a nivel molecular como *Trichoderma asperellum*, como se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2

Identificación molecular de Trichoderma mediante búsqueda en BLAST del ensamblaje de lecturas del fragmento de la región ITS

| Longitud (pb) | Organismo | Porcentaje de Identidad (%) | N° Accesoión |
|---------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------|
| 571 | <i>Trichoderma asperellum</i> | 100 | MK841003.1 |

6.2.2.6. Confrontación de *Trichoderma* spp con hongos fitopatógenos.

Para las pruebas de confrontación *in vitro*, se realizaron dos ensayos. En el primero, se permitió que el patógeno creciera durante 7 días. Posteriormente, se colocó el antagonista para llevar a cabo la prueba de confrontación *in vitro*, en la cual se ubicó el patógeno en un extremo con discos de micelio de los patógenos (0,5 cm de

diámetro) en una de las áreas de la placa. Tras un crecimiento de aproximadamente 3 cm, se agregó un disco de 0,5 cm de *Trichoderma* spp en el extremo opuesto. El diseño experimental se realizó al azar con tres (3) repeticiones por tratamiento (Martínez, 2012).

En el segundo ensayo, se realizó la confrontación simultánea del patógeno con el antagonista. Para ello, se colocaron dos puntos en la caja Petri, separados por 4 cm. En cada extremo se dispuso un disco de 5x5 mm del patógeno y un disco de 5x5 mm del antagonista. La confrontación se dejó durante un período de 10 días.

6.2.2.7. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial.

Para calcular el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR), se llevó a cabo un ensayo de siembra dual en cajas Petri con agar PDA. En cada caja, se colocó un disco de 5 mm de diámetro con micelio del antagonista en un extremo, y en el extremo opuesto, un disco de 5 mm con el patógeno. Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento. Para el control del tratamiento, se insertan discos con micelio activo de los patógenos *Fusarium*, *Botrytis* y *Bipolaris*. Las cajas con los distintos tratamientos y controles se incubaron en condiciones de laboratorio a 28°C, y la evaluación se realizó una vez que el crecimiento del patógeno en el control cubrió completamente la superficie de la caja Petri (Martínez, 2012).

El porcentaje de inhibición fue calculado usando la siguiente formula:

$$PICR: \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

Dónde:

R₁: Radio de crecimiento del patógeno sin inhibición a los 10 días.

R₂: Radio de crecimiento del patógeno con inhibición de *Trichoderma*

6.2.2.8. Producción masiva de hongos antagonistas

La reproducción masiva de *Trichoderma* se realizó en sustrato de arroz, siguiendo un procedimiento similar al de las trampas. El sustrato se escurrió por 15 minutos y se colocó en fundas de polipropileno, asegurando los extremos con grapas. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se dejó reposar hasta enfriar (Hidalgo & Tello, 2022).

6.2.2.9. Inoculación de hongo antagonista

Se preparó un medio de cultivo líquido de caldo de papa-dextrosa, hirviendo 8 gr de papa y añadiendo 20 gr de dextrosa en un (1) litro de agua. Se tomaron 45 mm de micelio puro a partir de las cajas Petri, Fragmentos de *Trichoderma* se transfirieron a este caldo y se agitó para suspender las esporas.

La suspensión se inyectó en el sustrato con una jeringa estéril y se selló el orificio con cinta masking. Se incubó en oscuridad a 28°C y luego se expuso a luz fluorescente para promover la esporulación. Después de dos semanas, se apreció la colonización del sustrato (Hidalgo & Tello, 2022).

6.2.2.10. Preparación de ensayo de suelos.

Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron un total de 9 macetas con dimensiones de 17.5 cm de ancho y 15 cm de alto, elegidas por su tamaño adecuado para el tipo de ensayo a realizar. Cada una de estas macetas fue asignada a un tratamiento experimental específico, según el diseño establecido para el estudio. Los tratamientos se determinaron en función de las variables que se querían evaluar. Una vez seleccionadas las macetas, se procedió a etiquetarlas de manera clara y legible, para asegurar la correcta identificación de cada una durante todo el proceso experimental. Las etiquetas fueron colocadas en lugares visibles para facilitar su

reconocimiento y seguimiento. De esta manera, se garantizó que cada maceta recibiera el tratamiento correspondiente y se mantuviera un control adecuado en cada fase del experimento.

El Anexo F presenta una imagen que ilustra cómo fueron etiquetadas las macetas de acuerdo a los tratamientos, proporcionando una referencia visual que facilita la comprensión del diseño experimental y su implementación práctica.

6.2.2.11. Preparación del suelo

Se recolectaron muestras en cada uno de los sitios de estudio, obteniendo 3 kilogramos de suelo natural por punto de muestreo. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un proceso de esterilización en autoclave para eliminar cualquier contaminante ajeno al patógeno de interés y se añadieron 00 gramos de arroz al sustrato para facilitar la colonización y desarrollo de los hongos patógenos.

6.2.2.12. Inoculación de suelos con patógenos

Para inocular los suelos se procedió según los procedimientos señalados por Bejarano *et al.* (2024), o sea, preparar un medio de cultivo líquido de caldo de papa-dextrosa, hirviendo 8 gr de papa y añadiendo 20 gr de dextrosa en un (1) litro de agua. En las cajas Petri tomando 45 mm de micelio puro, se realizaron fragmentos de medio de cultivo con micelio y esporas de cada uno de los patógenos los cuales fueron colocados al caldo, se hizo un vórtex de las muestras y se obtuvo un medio líquido de cada hongo (Hidalgo & Tello, 2022).

A continuación, se realizó un conteo de esporas utilizando la cámara de Neubauer para determinar la concentración del patógeno que se introdujo en el suelo con la siguiente fórmula:

$$\frac{esp}{g \text{ o } ml} = promedio \# \text{ esporas} \times factor \text{ de dilucion}$$

Una vez determinada la concentración en el medio líquido, se preparó un inóculo con una concentración de 1×10^7 esp/ml para cada patógenos, de acuerdo con los tratamientos planificados (Hidalgo & Tello, 2022).

6.2.2.13. Aplicación del inóculo de *Trichoderma* spp en suelo con hongos patógenos

Una semana después de la inoculación de los patógenos, se aplicaron 10 ml de solución de *Trichoderma* en una concentración de 1×10^7 esp/ml en cada caja según los tratamientos, mezclándolos hasta homogenizar el suelo. Este procedimiento se repitió una vez por 7 días durante dos semanas (Hidalgo & Tello, 2022).

6.2.2.14. Tratamientos

Se realizaron tres (3) tratamientos control y seis (6) tratamientos de ensayo, según se indica en la tabla 3.

Tabla 3.

Detalles de los tratamientos de ensayo.

| Tratamiento | descripción |
|--------------------|---|
| TC1 | Suelo + <i>Botrytis</i> spp |
| TC2 | Suelo + <i>Bipolaris</i> spp |
| TC3 | Suelo + <i>Fusarium</i> spp |
| T1 | Suelo + <i>Botrytis</i> spp + <i>Trichoderma</i> spp |
| T2 | Suelo + <i>Bipolaris</i> spp + <i>Trichoderma</i> spp |
| T3 | Suelo + <i>Fusarium</i> spp + <i>Trichoderma</i> spp |
| T4 | Suelo + <i>Trichoderma</i> spp + <i>Botrytis</i> spp |
| T5 | Suelo + <i>Trichoderma</i> spp + <i>Bipolaris</i> spp |
| T6 | Suelo + <i>Trichoderma</i> spp + <i>Fusarium</i> spp |

6.2.2.15. Evaluación de carga fitopatógena en suelos

Siguiendo la metodología de Berumen (2017), se tomó una muestra de 1 gr de sustrato colonizado de cada tratamiento y se colocó en tubos de ensayo con 9 ml de solución estéril de Tritón X-100 al 0,1% resultando diluciones de 10⁻¹, se agitó en un vórtex hasta que la muestra se homogenizó por completo. A partir de estas muestras, se realizaron dos diluciones seriadas (hasta 10⁻³), tomando muestras de 1000ul para colocarlo en un nuevo tubo de ensayo con 9ml sucesivamente (Hidalgo & Tello, 2022).

Se trabajó con los resultados obtenidos al inicio y al final del ensayo con una duración de 15 días posterior a la aplicación del tratamiento. Se realizó un conteo de esporas en la cámara de Neubauer contando un promedio de 12 lecturas para

determinar la concentración de cada tratamiento y verificar la capacidad antagónica de *Trichoderma* en cada uno de ellos. A tales efectos se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{esp}{g \text{ o } ml} = promedio \# \text{ esporas} \times factor \text{ de dilucion}$$

En la Tabla 4 se describen los análisis realizados en cada etapa del estudio.

Tabla 4

Resumen de análisis realizados en cada fase del estudio

| Fase del Estudio | Actividad | Número de Análisis | Método | Resultados Esperados |
|-------------------------|---|---|--|--|
| Fase de Campo | Muestreo | 3 sectores, Sangolquí, Amaguaña y la Finca Agroecuasol (Guayas) | Selección de subparcelas cerca de plantas que muestren síntomas por enfermedad | Identificación de áreas con problemas de patógenos (Bipolaris, Fusarium, Botrytis) |
| | Instalación de trampas (9 trampas en total) | 9 trampas (3 por sector) | Trampas con arroz precocido y enterradas a 20 cm de profundidad | Aislamiento de fitopatógenos mediante trampas en el suelo |
| | Recuperación de trampas | 9 trampas (una por sector) | Recolección cuidadosa para evitar alteraciones | Identificación de colonias fúngicas en los frascos de trampa |
| | Preparación de medios de cultivo y siembra | - | Preparación de agar PDA y siembra en placas Petri | Cultivo de hongos fitopatógenos en condiciones controladas |

| | | | | |
|---------------------|---|---|--|---|
| Fase de Laboratorio | Aislamiento de microorganismos | Según las muestras recolectadas | Aislamiento en agar PDA con siembra estéril | Aislamiento de fitopatógenos como <i>Bipolaris</i> y <i>Fusarium</i> |
| | Purificación de microorganismos | | Subcultivo en placas de agar para purificación | Cultivo puro de cepas de hongos de interés |
| | Confrontación de <i>Trichoderma</i> con patógenos | 2 ensayos con 3 repeticiones por tratamiento | Siembra en placas Petri con <i>Trichoderma</i> y patógenos | Evaluación de la interacción antagonista entre <i>Trichoderma</i> y los patógenos |
| | Producción masiva de hongos antagonistas (<i>Trichoderma</i>) | | Sustrato de arroz y autoclave | Producción masiva de <i>Trichoderma</i> en condiciones controladas |
| | Preparación de cajas de ensayo (9 macetas) | 9 macetas por tratamiento | Etiquetado y asignación de tratamientos | Control de los tratamientos experimentales en macetas |
| | Aplicación de inóculo de patógenos en suelo | 1 única aplicación por ensayo según el tratamiento. | Aplicación de un inóculo con una concentración de 1×10^6 esp/ml para cada patógenos | Suelos contaminados con patógenos para la futura aplicación de tratamientos. |
| | Aplicación de inóculo de <i>Trichoderma</i> en suelos | 1 aplicación por semana durante 1 mes | Solución líquida de <i>Trichoderma</i> aplicada a suelos | Evaluación del control biológico de los patógenos en suelos |
| | Evaluación de carga fitopatógena en suelos | 1 muestra por tratamiento | Método de dilución en solución de Tritón X-100 y conteo en | Determinación de la concentración de patógenos en suelos |

| | | | | |
|------------------------------|--|--|---|---|
| | | | cámara de Neubauer | |
| Fase de Análisis Estadístico | Análisis estadístico de los resultados | | ANOVA de una sola vía para determinar las pruebas de significancia. | Determinación de la eficacia de <i>Trichoderma</i> contra los patógenos en los suelos |

6.2.3. Análisis estadístico

Para normalizar los porcentajes de los ensayos, se aplicó una prueba de normalidad de Andersen para determinar si los datos obtenidos tienen una distribución paramétrica o no paramétrica. Las diferencias significativas en el crecimiento y porcentaje de inhibición de las cepas de *Trichoderma* spp. sobre las cepas del patógeno se analizaron mediante un ANOVA de una sola vía. También se evaluó el impacto de los factores, como la cepa de *Trichoderma* spp. y la cepa del patógeno, sobre el porcentaje de inhibición. De igual forma para determinar la concentración de fitopatógenos en los suelos se analizar. Todos los análisis estadísticos se efectuaron con el programa Minitab Statistical Software 22, y las gráficas se diseñaron con Excel (Microsoft Office, 2007).

CAPÍTULO IV

7. RESULTADOS

En el contexto del manejo de enfermedades de plantas, el uso del hongo *Trichoderma* spp. ha cobrado importancia gracias a su capacidad para controlar patógenos del suelo. En tal sentido, este trabajo pone el foco en evaluar la efectividad de diversas cepas de *Botrytis* spp., *Bipolaris* spp. y *Fusarium* spp. en confrontación con aislamientos de *Trichoderma* spp., en condiciones *in vitro*.

La elección de estos patógenos se fundamenta en su significativa relevancia en el campo de la fitopatología, ya que representan una amenaza importante para la salud de las plantas. Estos microorganismos patógenos afectan la vitalidad de las plantas y comprometen la producción agrícola, causando pérdidas económicas considerables. Además, su proliferación se ve favorecida en suelos contaminados, donde las condiciones ambientales y la acumulación de contaminantes crean un entorno propicio para su desarrollo. Esto pone en importancia la necesidad de entender su comportamiento y controlar su impacto, principalmente en sistemas agrícolas que enfrentan desafíos relacionados con la contaminación del suelo.

Como parte de este trabajo se realizaron pruebas *in vitro* que ayudaron a observar la interacción entre estos microorganismos, aportando información muy interesante en torno a la potencial acción de biocontrol de *Trichoderma* spp. frente a los hongos fitopatógenos seleccionados. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de estas pruebas, los cuales ofrecen una visión acerca de la efectividad de los aislamientos de *Trichoderma* spp. en el manejo de los patógenos evaluados.

7.1. Aislamiento y caracterización macroscópica y microscópica de hongos patógenos.

Tras un periodo de incubación de tres días a 25 °C en medio de cultivo PDA, en condiciones de oscuridad, se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados. Las colonias de los diferentes aislamientos mostraron características visuales típicas de los géneros *Fusarium* spp., *Botrytis* spp. y *Bipolaris* spp.

En términos de morfología macroscópica, las colonias presentaron una variedad de coloraciones específicas en el medio PDA, las cuales son distintivas para cada patógeno. Estas variaciones en el color, la textura, el aspecto, la altura del micelio y el tipo de crecimiento permiten una identificación preliminar de los hongos aislados. Los aislamientos etiquetados para identificación como *Fusarium* spp., *Botrytis* spp. y *Bipolaris* spp. presentaron características específicas propias del género, las cuales fueron comparadas con fichas técnicas documentadas en la literatura científica (ver Anexo O).

Asimismo, se realizó un análisis microscópico para caracterizar las estructuras fúngicas. Esta evaluación se fundamentó en las características de las hifas, las esporas y el micelio, se contrastó con la información bibliográfica disponible sobre los aislamientos obtenidos. Las características microscópicas, que incluyen la forma y disposición de los conidios y hifas, corroboran la identificación de los hongos en función de las descripciones taxonómicas reconocidas en la literatura científica. (López *et al.*, 2020)

7.2. Confrontación *in vitro*

A partir de los datos obtenidos en los dos ensayos realizados con hongos patógenos contra *Trichoderma* spp. se hizo una prueba de normalidad de Anderson - Darling para el primer ensayo realizado con 3 tratamientos diferentes con cada patógeno, la cual muestra que en todos ellos los valores son superiores a 0,05 (Anexo H), e indica que los datos no presentan desviaciones significativas. Por lo tanto, se puede asumir que existe una normalidad en los datos, permitiendo el uso de pruebas paramétricas como Anova. Posteriormente se aplicó Anova de una sola vía.

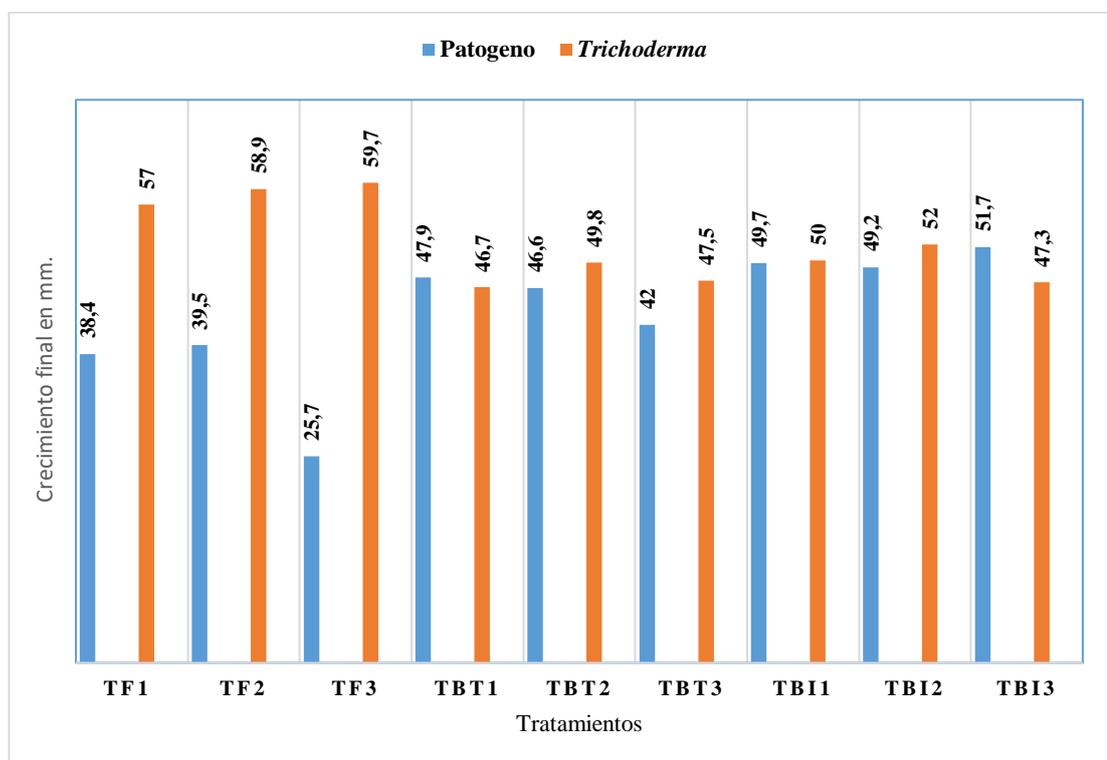
Los resultados de Anova muestran un valor $p = 06986$, siendo este mayor al nivel de significancia de 0,05. Por lo tanto, se acepta la hipótesis nula ya que las medias son iguales y que no existe diferencias significativas entre los tres (3) grupos de tratamiento. El análisis de varianza deja claro que no hay una diferencia significativa entre los tres (3) grupos de tratamiento con una varianza negativa entre los mismos (-48,4155) y el coeficiente de correlación intraclase (ICC) es de -0,109199, lo que sugiere que la variabilidad entre los grupos es mínima (Anexo I).

Para el segundo ensayo de las pruebas de confrontación *in vitro*, se realizó una prueba de normalidad de Anderson-Darling. Este análisis permitió determinar si los datos presentaban una distribución normal, indicando que se pueden utilizar métodos estadísticos paramétricos, o si, por el contrario, se trataba de datos no paramétricos. Los resultados han puesto en evidencia que los datos para el segundo ensayo también son paramétricos, debido a que los valores son superiores a 0,05 en los 3 tratamientos (Anexo J). Posteriormente también se realizó una prueba de Anova de una sola vía.

Los resultados de Anova arrojan un valor $p = 0,7125$, que resulta superior al nivel de significancia de $0,05$, por ello, se acepta la hipótesis nula indicando que las medias son iguales y que no hay diferencias significativas entre los tres (3) grupos de tratamiento. El análisis de varianza refleja que no hay una diferencia significativa entre los tres (3) grupos de tratamiento con una varianza negativa entre ellos ($-13,0944$), mientras que el coeficiente de correlación intraclase (ICC) es de $-0,0786426$, y significa que la variabilidad entre los grupos es mínima (Anexo K) Dicha comparativa en el crecimiento de los ensayos se muestra en la figura 6.

Figura 6.

Resultados del crecimiento de los patógenos en el primer ensayo



Nota. Los datos de la parte superior de las barras representan crecimiento en mm.

En el primer ensayo, se evaluaron diversos tratamientos en los cuales se otorgó una ventaja de 7 días a los patógenos antes de la aplicación de *Trichoderma* spp. Los

resultados mostraron que, En los tratamientos TF, el antagonista mostró un crecimiento superior, incluso frente a la ventaja inicial del patógeno. En la repetición TF1 el antagonista experimentó un crecimiento de 57 mm en 15 días, lo que resultó en una inhibición significativa del patógeno, que solo alcanzó un crecimiento de 38,4 mm. De manera similar, en el tratamiento TF2, *Fusarium* creció 39,5 mm, mientras que *Trichoderma* mostró un crecimiento de 58,9 mm. En el tratamiento TF3, el patógeno logró un crecimiento máximo de 25,7 mm, en contraste con los 58,9 mm alcanzados por *Trichoderma*, lo que demuestra su efectiva capacidad antagonista.

En el caso de la interacción entre *Trichoderma* y *Botrytis* spp., en la repetición TBT1 se observó que el patógeno alcanzó un crecimiento máximo de 48 mm, entre tanto, *Trichoderma* llegó a 45,6 mm. Sin embargo, se registró una inhibición notable de *Trichoderma* en la curva de crecimiento, En TBT2, *Trichoderma* presentó un crecimiento de 49,8 mm, superando a *Botrytis*, que logró crecer 46,6 mm. En TBT3 el crecimiento de *Trichoderma* fue de 47,5 mm, mientras que *Botrytis* alcanzó únicamente 42mm. Estos resultados evidencian la capacidad variable de *Trichoderma* para antagonizar a *Botrytis* en diferentes condiciones experimentales.

En el tratamiento de *Trichoderma* sobre *Bipolaris*, se observaron los siguientes resultados: en TBI1, el patógeno alcanzó un crecimiento de 49,7 mm, mientras que *Trichoderma* mostró un crecimiento ligeramente superior (50 mm). En TBI2, el crecimiento de *Trichoderma* fue de 52 mm, en comparación con *Bipolaris*, que creció hasta 49,2 mm. Por último, en TBI3, el patógeno superó a *Trichoderma*, con un crecimiento de 51,7 mm, mientras que *Botrytis* llegó a 47,3 mm. Estos resultados permiten señalar que hay variabilidad en la interacción entre ambos hongos en las distintas repeticiones del experimento

En la curva de crecimiento se nota que, a pesar de que en algunos tratamientos el patógeno mostró un mayor crecimiento, desde el momento en que se introdujo Trichoderma en la placa, el patógeno experimentó una inhibición notable de su crecimiento, lo que impidió su desarrollo posterior (Ver figuras 7,8 y 9).

Figura 7.

Crecimiento de Fusarium vs Trichoderma.

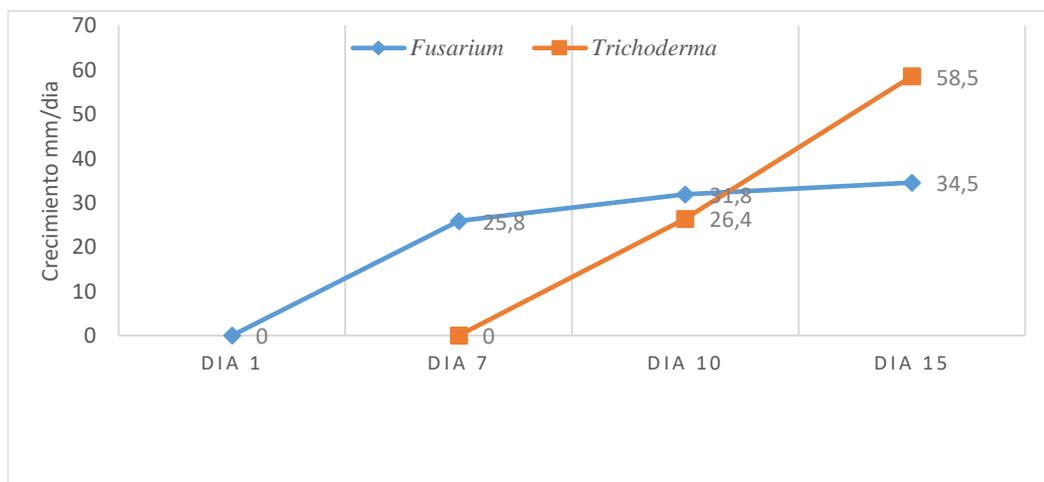


Figura 8.

Crecimiento de Botrytis vs Trichoderma.

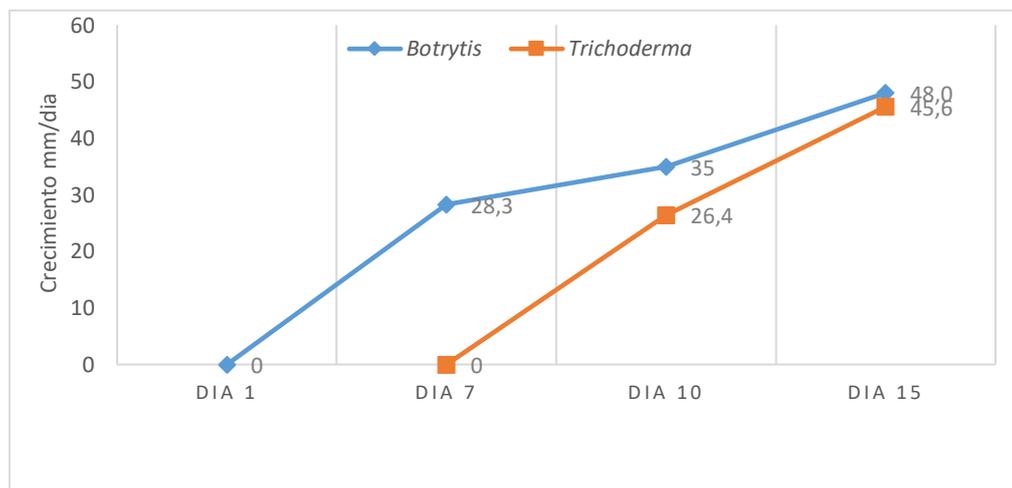
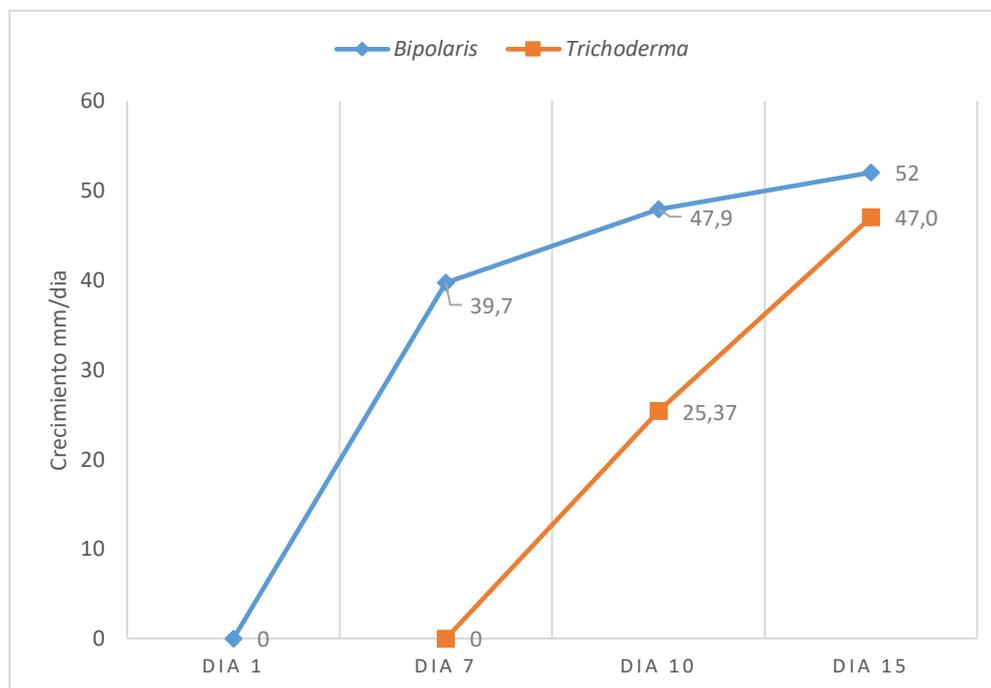


Figura 9.

Crecimiento de Bipolaris vs Trichoderma.



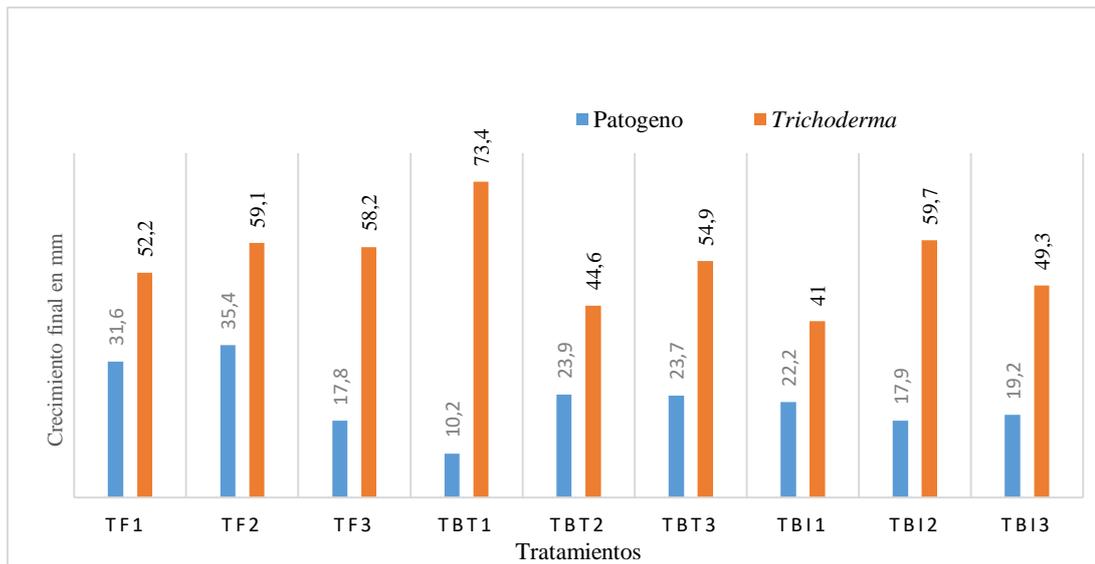
Se encontró en la mayoría de las repeticiones, que Trichoderma tuvo un crecimiento superior al del patógeno a los 15 días. En relación a Fusarium, se constató que el patógeno y el antagonista no establecieron un contacto directo, dado que el mecanismo de acción de Trichoderma contra este patógeno se basó en la antibiosis, mediada por la producción de enzimas y metabolitos tóxicos que le impidieron su desarrollo y crecimiento.

En contraste, en las interacciones con Botrytis y Bipolaris, si se evidenció un contacto directo gracias a que hubo el mecanismo de acción por medio de micoparasitismo, con enrollamiento de Trichoderma, que inhibió completamente el crecimiento de los patógenos y, en algunos casos, los llevó a su eliminación total.

En la segunda prueba de la interacción entre *Trichoderma* y patógenos se pudo notar los distintos crecimientos de cada uno en las diferentes repeticiones, en donde se realizó una confrontación de patógeno y antagonista el mismo día, tal como se observa en la figura 10.

Figura 10.

Crecimientos de patógenos y Trichoderma en el segundo ensayo.



En esta prueba, los patrones de crecimiento resultaron notablemente diferentes puesto que el patógeno y el antagonista se introdujeron de forma simultánea en las mismas condiciones. En el tratamiento de *Trichoderma* sobre *Fusarium*, se pudo evidenciar que, en todas las repeticiones, *Trichoderma* superó en crecimiento a *Fusarium*, cubriendo más del 60% de la superficie y evitando su desarrollo. Este efecto lo atribuyen Torres *et al.* (2013) al mecanismo de acción de micoparasitismo, que se manifiesta a través del enrollamiento de las hifas del antagonista.

En el segundo tratamiento de *Trichoderma* sobre *Botrytis* spp., se observó un crecimiento notable del primer hongo sobre el patógeno, el cual registró un crecimiento prácticamente nulo en todas las repeticiones. Esto indica que

Trichoderma inhibió por completo el crecimiento de Botrytis, resultado similar al reportado por Grados (2024), colonizándolo totalmente y eliminándolo.

De manera similar, en el tratamiento con este hongo sobre Bipolaris, se observó un crecimiento significativamente mayor, que inhibió el desarrollo del patógeno mediante micoparasitismo, lo que a su vez impidió el crecimiento y desarrollo de Bipolaris. Este hecho igualmente se aprecia en la curva de crecimiento de esta prueba, donde se evidencia las diferencias en los patrones de crecimiento entre el patógeno y el antagonista. Las figuras 11, 12 y 13 presentan los datos relacionados con el crecimiento de Trichoderma, Fusarium, Botrytis y Bipolaris.

Figura 11.

Crecimientos de Fusarium y Trichoderma P2

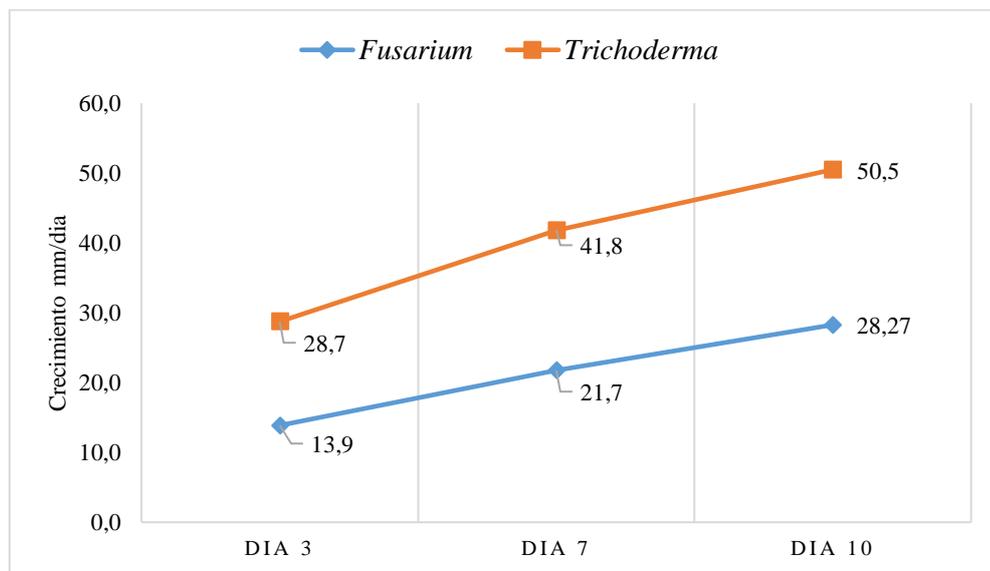


Figura 12.

Crecimientos de Botrytis y Trichoderma P2

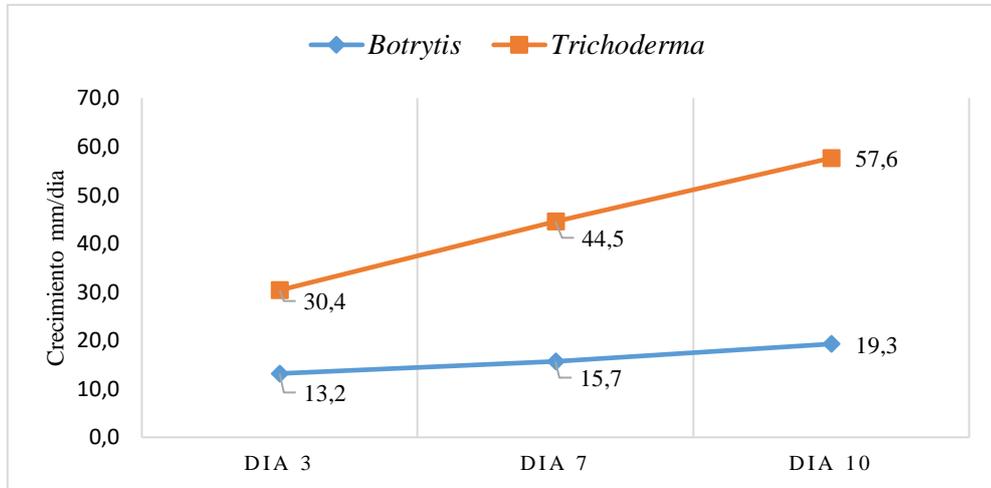
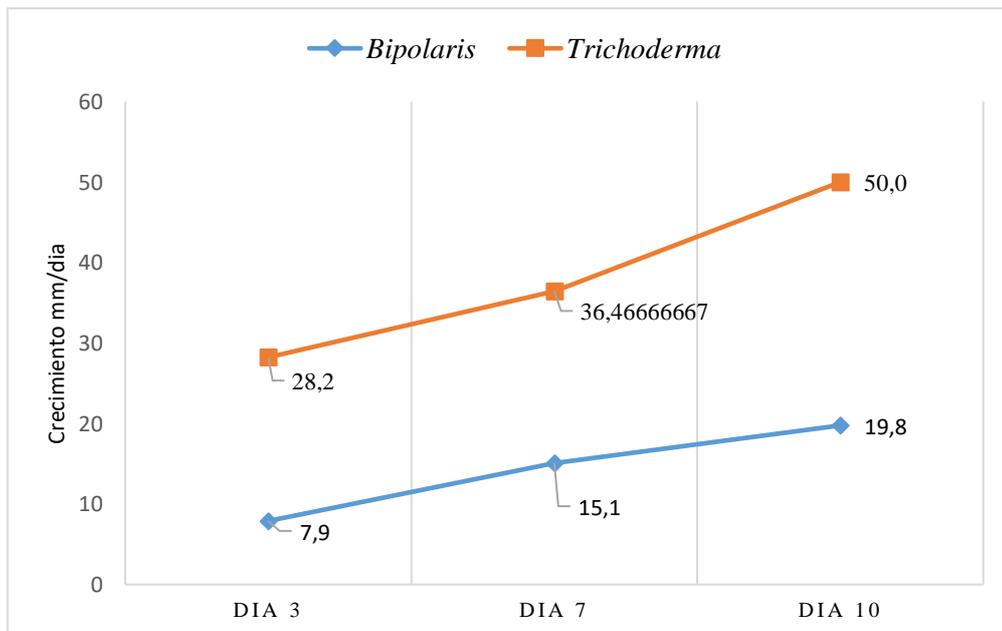


Figura 13.

Crecimientos de Bipolaris y Trichoderma P2



Como se observa en las curvas de crecimiento, el antagonista mantuvo un desarrollo significativamente superior debido a su capacidad de crecimiento acelerado en comparación con el patógeno. Esto permitió un biocontrol altamente efectivo, ya que el crecimiento del patógeno fue lento debido a la inhibición ejercida por el antagonista, lo que impidió su desarrollo completo y su colonización total en la placa.

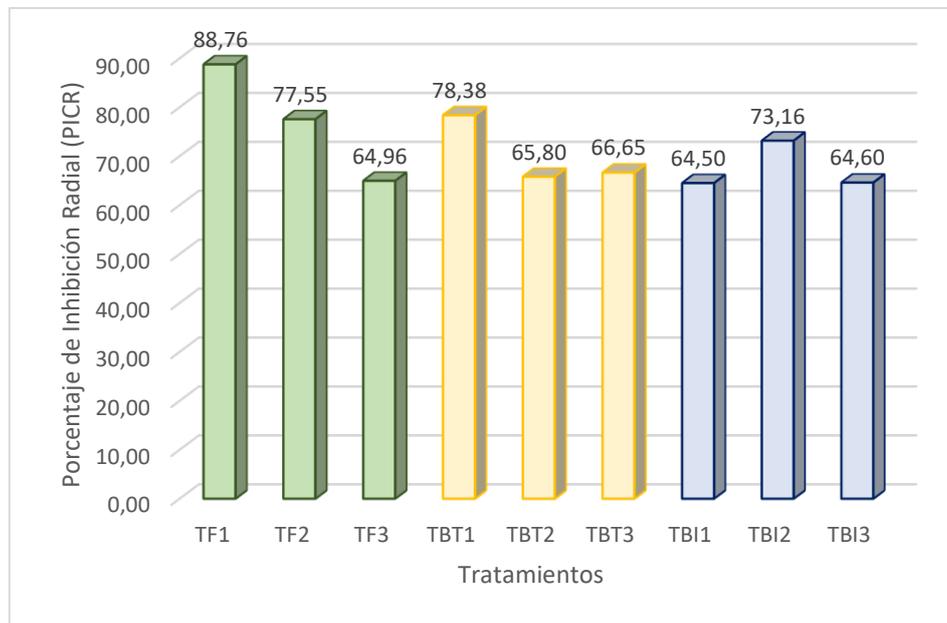
Porcentaje de inhibición de crecimiento radial.

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de confrontación *in vitro* para evaluar el porcentaje de inhibición de los patógenos, se realizó la prueba de normalidad de Anderson-Darling. Esta prueba permitió determinar si los datos seguían una distribución paramétrica o no paramétrica, revelando que en todos los casos los valores fueron superiores a 0,05 (Anexo L). Esto indica que no existen desviaciones significativas en los datos, lo que permite asumir que presentan una distribución normal. En consecuencia, fue posible aplicar pruebas paramétricas, como el análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

Los resultados de Anova arrojaron un valor de $p = 0,4129$, superior al nivel de significancia establecido en 0,05. Por consiguiente, se acepta la hipótesis nula, lo que indica que las medias son iguales y no se observan diferencias significativas en los resultados del PICR. Tanto el valor de F (1,029) como el p-valor (0,4129) confirman la ausencia de diferencias significativas entre las medias de los grupos evaluados como se puede observar en el Anexo N.

Figura 14.

Porcentaje de inhibición radial (PICR) Según el tratamiento.



Se observa que en todos los tratamientos se alcanzó una inhibición superior al 60%. En los tratamientos para *Fusarium*, se observó una inhibición superior al 64% hasta un 88,76%, lo que demuestra que el patógeno sufrió una inhibición considerable por parte del antagonista. En los tratamientos para *Botrytis*, la inhibición alcanzó valores superiores al 65%, llegando hasta un 78,38%, lo que refleja una excelente eficacia del biocontrol ejercido por el antagonista. Finalmente, en el caso de los tratamientos para *Bipolaris*, en las tres repeticiones se registró una inhibición mayor al 64% hasta un 73,16% lo que indica que el antagonista tuvo un efecto significativo sobre el patógeno. (Figura 14).

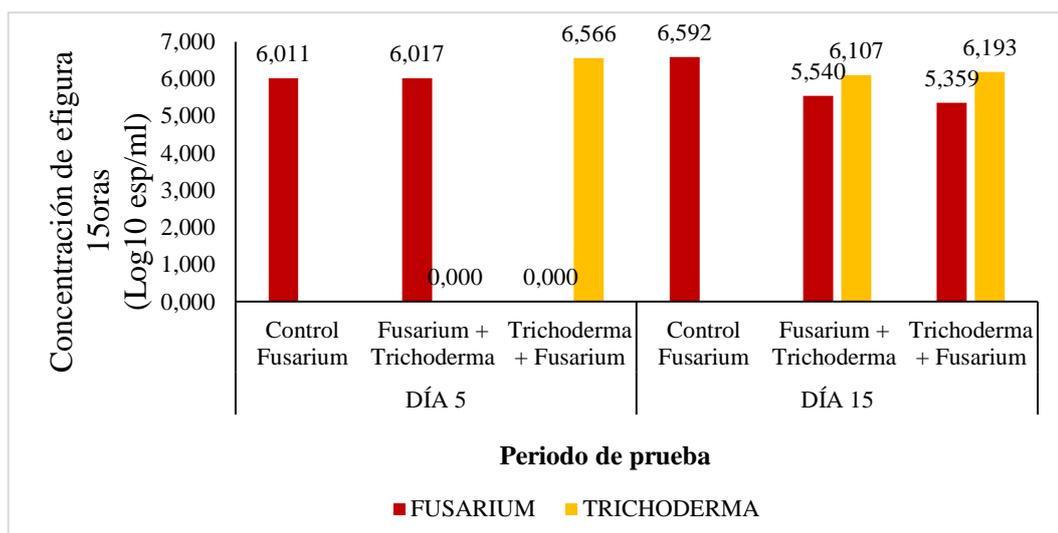
7.3.Evaluación de carga fitopatógena en suelos

Para el ensayo de suelos se realizaron dos evaluaciones de la carga fitopatógena. La primera se llevó a cabo utilizando suelo que contenía únicamente el patógeno, permitiendo observar su crecimiento sin ningún tipo de inhibición. En la segunda

evaluación se aplicaron los tratamientos con Trichoderma correspondientes a cada muestra de suelo, lo que permitió realizar una comparación del crecimiento del patógeno antes y después del tratamiento como se observa en las figuras 15, 16 y 17.

Figura 15

Carga fitopatógena de Fusarium en suelos en los distintos tratamientos.



Nota: Los datos de la parte superior de las barras representan la carga fitopatógena de Trichoderma sobre Fusarium según su concentración en esp/ml.

Se denota que, cuando el patógeno crece sin inhibición, su desarrollo es rápido y lineal, como se aprecia en la primera evaluación del día 5. Sin embargo, al aplicar el tratamiento con el antagonista, el patógeno se inhibe por completo, reduciendo su esporulación y permitiendo que el antagonista colonice casi por completo el suelo.

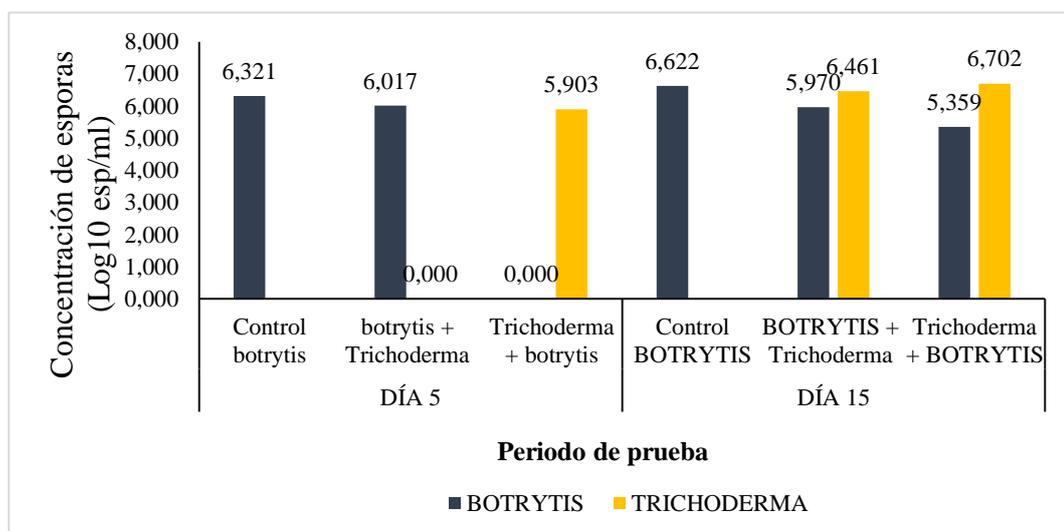
En el tratamiento donde se aplicó primero el antagonista, se aprecia que el crecimiento del patógeno es muy limitado, con un desarrollo prácticamente nulo, ya que el antagonista inhibe su proliferación. Este resultado es similar al que

encontraron Quintanilla y Reyes (2023) en un estudio de la efectividad de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* sobre *Fusarium* en semillas de tomate.

En los tratamientos con *Botrytis* también se ven diferencias en las cargas fitopatógenas en el suelo, como se ilustra en la figuras 16.

Figura 16

Carga fitopatógena de Botrytis en suelos en los distintos tratamientos



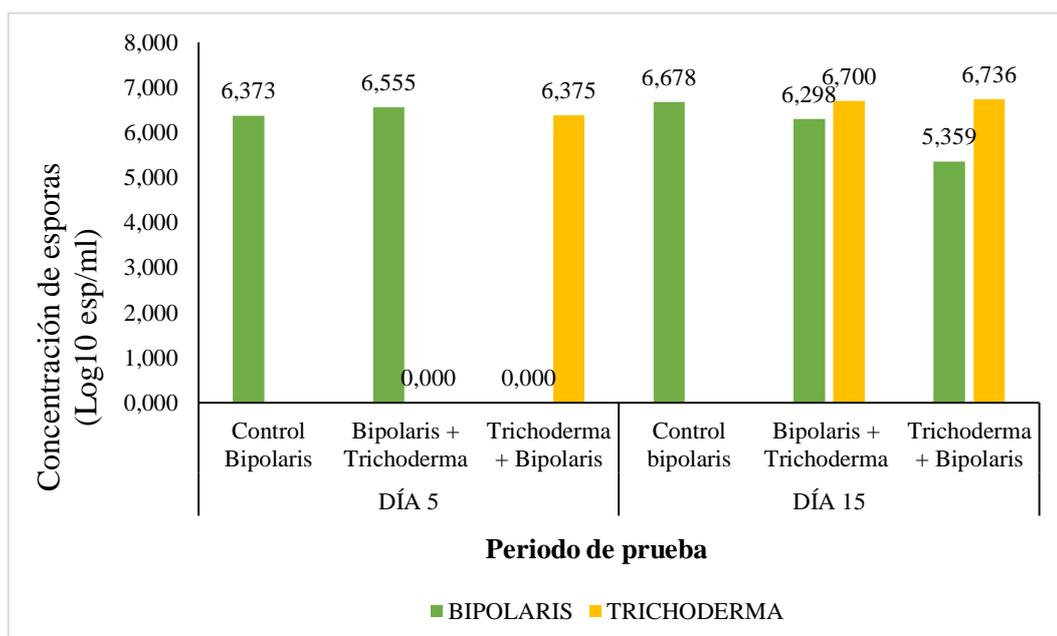
Nota: Los datos de la parte superior de las barras representan la carga fitopatógena de *Trichoderma* sobre *Botrytis* según su concentración en esp/ml.

En estos tratamientos, se observa que, cuando el patógeno crece sin inhibición, su desarrollo es constante y lineal. Sin embargo, al aplicar los tratamientos con el antagonista, se nota una inhibición significativa, con una disminución en la esporulación del patógeno y un crecimiento visiblemente mayor del antagonista sobre él. De manera semejante, en el tratamiento T+B, donde el antagonista fue aplicado primero, el crecimiento del patógeno es mínimo, con un desarrollo casi nulo.

En los tratamientos con Bipolaris + Trichoderma, la carga fitopatógena en los suelos mostró un comportamiento parecido al de los dos tratamientos anteriores, tal cual se aprecia en la figura 17.

Figura 17

Carga fitopatógena de Bipolaris en suelos en los distintos tratamientos.



Nota: Los datos de la parte superior de las barras representan la carga fitopatógena de Trichoderma sobre Botrytis según su concentración en esp/ml.

Del mismo modo que en los tratamientos con Fusarium y Botrytis, en el caso de Bipolaris se evidencia que, al existir una inhibición notable, la carga fitopatógena muestra un crecimiento bajo a comparación con el control. No obstante, al hacer la aplicación de tratamiento con Trichoderma, el desarrollo del patógeno registra una evidente disminución, incluyendo igualmente, una reducción de esporas, lo cual, deja ver que Trichoderma inhibe su proliferación por completo. Así mismo, en el tratamiento donde Trichoderma fue aplicado primero, fue limitado el crecimiento del patógeno, sin capacidad para volver a desarrollarse desde ese punto.

CAPITULO V

8. DISCUSIONES, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1.DISCUSIÓN

Los resultados de la investigación fundamentan la idea de que *Trichoderma* tiene un potente efecto inhibitor sobre los patógenos, probablemente a través de mecanismos de competición por recursos, de la producción de compuestos antifúngicos o la inducción de defensas en las plantas, lo cual coincide con los resultados de Mesa et al. (2019), autores que encontraron efecto inhibitor sobre *Bipolaris*, así como con los estudios de Bedoya (2022), quien concluye que el empleo de alternativas biológicas para el control de los granos/semillas tiene la potencialidad de ser una alternativa sustentable, más amigable con la naturaleza, y contribuir en la disminución del uso desmedido de fungicidas, y por tanto, representa un avance notable para aminorar la propagación de patologías por medio de semillas.

Con dichos antecedentes, es posible afirmar que la aplicación de *Trichoderma* parece tener mayor efectividad al aplicarlo anticipadamente, lo cual da pie a una colonización previa y, por ende, una competencia de mayor agresividad hacia el patógeno. Este hecho enfatiza en el valor de la estrategia de manejo integrado de plagas, en el que, tanto el momento como la secuencia de aplicación de biocontroladores tienen la posibilidad de ser determinantes para un control efectivo. No obstante, estos resultados, podrían indicar que la presencia de *Bipolaris* en el componente edáfico hay que manejarla más eficientemente, con un modelo específico y rigurosamente controlado de las aplicaciones, acrecentando la efectividad de *Trichoderma*.

Por su parte, los hallazgos obtenidos en los ensayos *in vitro* y en suelos contaminados dan fuerza a la afirmación de la eficacia de *Trichoderma* sp. como biocontrolador frente a los patógenos *Fusarium*, *Botrytis* y *Bipolaris*. Es así que, los mecanismos de biocontrol de *Trichoderma* son multifacéticos e incluyen antibiosis, competencia por nutrientes y espacio, y micoparasitismo.

En el caso de *Fusarium*, se pudo apreciar que *Trichoderma* tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento del patógeno sin un contacto directo, lo que sugiere un mecanismo de antibiosis. Esta conclusión está en línea con estudios previos que demuestran que *Trichoderma* produce metabolitos secundarios como las trichoderminas, que son responsables de la inhibición de muchos patógenos de suelo, incluyendo *Fusarium*.

En los ensayos con *Botrytis* y *Bipolaris*, la inhibición fue más directa. En estos casos, *Trichoderma* formó una capa sobre las hifas de los patógenos, lo que hace pensar que el mecanismo principal de control fue el micoparasitismo. Este fenómeno ocurre cuando *Trichoderma* invade y destruye las estructuras del patógeno, un proceso documentado en estudios como el de Benítez et al. (2003) que reporta una interacción activa de *Trichoderma* con hifas de patógenos.

La competencia por espacio y nutrientes desempeñó un papel clave en los ensayos, donde *Trichoderma* mostró un crecimiento más rápido que los patógenos, lo que limitó su capacidad de proliferación. Este fenómeno coincide con lo descrito por Martínez (2012), quien señala que los hongos antagónicos, como *Trichoderma*, pueden ser más efectivos cuando crecen rápidamente sobre la superficie del medio,

al requerir más nutrientes y espacio para su desarrollo. Esta característica, que favorece el crecimiento rápido, es fundamental para que un hongo antagonico actúe como un controlador biológico eficaz, tal como lo evidencian las cepas estudiadas por Martínez en los sectores de Sta. Martha y La Independencia. De esta manera, el rápido crecimiento de Trichoderma no solo limita la expansión de los patógenos, sino que también lo convierte en una cepa prometedora para el control biológico.

En cuanto al control biológico, la aplicación de Trichoderma en suelos contaminados con Fusarium, Botrytis y Bipolaris mostró una inhibición considerable de la esporulación y el crecimiento de estos patógenos, lo que pone en evidencia la utilidad de Trichoderma como un controlador biológico en el área foliar y en el control de patógenos en el suelo. Este resultado cobra relevancia porque la contaminación del suelo por patógenos es uno de los principales factores que favorece la propagación de enfermedades, y el uso de Trichoderma podría reducir la necesidad de fungicidas químicos, que tienen efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud.

Los resultados también dan cabida para señalar que la aplicación de Trichoderma puede ser una herramienta eficaz en el manejo integrado de enfermedades, ya que permite una reducción significativa de los patógenos sin afectar negativamente al ecosistema del suelo. Sin embargo, la efectividad de Trichoderma probablemente tenga dependencia de varios factores, entre ellos, el tipo de suelo, la cantidad de materia orgánica y la humedad, lo cual será necesario evaluar en futuros estudios.

En el contexto de los resultados de este estudio, la reducción significativa se entiende como una disminución considerable de los patógenos en el suelo no atribuible al azar, sino estadísticamente demostrada. O sea, la aplicación de *Trichoderma* mostró una capacidad clara para disminuir la cantidad de patógenos presentes en el suelo de manera notable, y esta disminución fue comprobada mediante pruebas estadísticas que indicaron que la diferencia observada es real y no producto de fluctuaciones aleatorias.

Para determinar si la reducción fue significativa se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para comparar los efectos del tratamiento con *Trichoderma* contra un control. De esta manera, cuando los resultados mostraron que la reducción en la carga de patógenos fue mucho mayor que la que podría esperarse por casualidad, se asumió que la reducción fue significativa.

En referencia a las implicaciones para la agricultura sostenible, la investigación arrojó resultados que sugieren que *Trichoderma* tiene un enorme potencial para su aplicación en programas de manejo sostenible de cultivos. Su capacidad para controlar patógenos del suelo y minimizar el uso de pesticidas lo convierte en una opción viable para los productores agrícolas que buscan alternativas más ecológicas y económicas para controlar las patologías en sus agroecosistemas.

Por último, aunque los ensayos *in vitro* han demostrado resultados positivos, es recomendable materializar nuevas investigaciones que ayuden a determinar las condiciones óptimas de aplicación en el campo, como el momento de la inoculación y las dosis más efectivas. Igualmente, sería fundamental evaluar la persistencia de *Trichoderma* en el suelo a largo plazo, puesto que su efectividad pudiera estar sujeta a su capacidad para mantenerse activo en condiciones ambientales variables.

8.2.CONCLUSIONES

La evaluación ex situ de *Trichoderma* sp. como agente biorremediador demostró su alta efectividad en la reducción de la carga fitopatógena en suelos contaminados con hongos patógenos, como *Botrytis* sp., *Bipolaris* sp., y *Fusarium* sp. Las pruebas de laboratorio confirmaron su capacidad antagonista mediante la inhibición significativa del crecimiento de estos patógenos, con reducciones superiores al 80% en comparación con los controles, evidenciando su potencial para mitigar problemas fitosanitarios. Los resultados obtenidos posicionan a *Trichoderma* sp. como una herramienta biotecnológica viable y sostenible para la biorremediación de suelos agrícolas, promoviendo la salud del suelo y reduciendo la dependencia de agroquímicos convencionales.

Se logró obtener cepas de *Botrytis*, *Bipolaris* y *Fusarium* a partir de suelos contaminados, los cuales fueron aislados y purificados para su caracterización macro y microscópica lo que permitió su identificación molecular al coincidir con las comparaciones realizadas con la literatura científica. Estas cepas fueron almacenadas para su posterior confrontación con *Trichoderma* spp. Las pruebas *in vitro* demostraron interacción entre las cepas de los hongos fitopatógenos *Botrytis* sp., *Bipolaris* sp. y *Fusarium* sp. con diferentes aislamientos de *Trichoderma* sp.

La evaluación de la capacidad antagonista de *Trichoderma* sp. a través de pruebas de confrontación *in vitro* ha arrojado resultados significativos que permiten concluir que *Trichoderma* inhibe el crecimiento de los hongos fitopatógenos, y observa un crecimiento superior en la mayoría de los tratamientos. En el ensayo en que los hongos se introdujeron simultáneamente, *Trichoderma* mantuvo una ventaja de crecimiento considerable sobre los patógenos, especialmente contra *Botrytis* y *Fusarium*, donde se logró una inhibición casi total del crecimiento del patógeno. En la evaluación del porcentaje de inhibición radial, se observaron valores que

fluctuaron entre el 64% y el 88%, lo que demuestra que *Trichoderma* sp. ejerció un biocontrol significativo sobre los patógenos estudiados. Se concluye que el mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a *Fusarium* es principalmente antibiótico lo que quiere decir que su control es un poco más complejo, mientras que contra *Botrytis* y *Bipolaris* es de micoparasitismo lo que permite que el antagonista los colonice por completo e impida su propagación

En los resultados obtenidos en el ensayo de suelos se evidencian la notable efectividad de *Trichoderma* sp. en el control de la carga fitopatógena de suelos contaminados, particularmente frente a los patógenos *Fusarium* sp., *Botrytis* sp. y *Bipolaris* sp. a partir de las concentraciones en esp/ml se pudo conocer la carga fitopatógena en cada uno de los ensayos en donde se observó que *Trichoderma* sp. tiene un potencial preventivo que permite que *Trichoderma* gane efectividad en el suelo e impida en su mayoría el crecimiento de patógenos mejorando los mecanismos de defensa de las plantas. Mostró un desempeño variable en su interacción con estos hongos patógenos, dependiendo del tipo de patógeno y las condiciones experimentales. Sin embargo, en la mayoría de los casos, *Trichoderma* sp. demostró una capacidad significativa para inhibir el crecimiento de los patógenos, especialmente a través de mecanismos de antibiosis y micoparasitismo a través del enrollamiento de hifas.

8.3. RECOMENDACIONES

Promover el uso de *Trichoderma* sp. en programas de manejo integrado de enfermedades. Dado su demostrado potencial como biocontrolador de patógenos como *Fusarium* sp., *Botrytis* sp. y *Bipolaris* sp., se recomienda incorporarlo en estrategias de manejo integrado de enfermedades (MIE) en cultivos afectados por estos hongos patógenos, pues su capacidad para reducir la carga fitopatógena en suelos contaminados, a través de mecanismos de antibiosis y micoparasitismo, puede ser una alternativa efectiva y sostenible a los métodos químicos convencionales, contribuyendo a la mejora de la salud del suelo y la reducción de los costos asociados con el control químico.

Fomentar la aplicación preventiva de *Trichoderma* sp. en suelos contaminados, ya que tiene el potencial de ser eficaz para inhibir el desarrollo de *Fusarium*, *Botrytis* y *Bipolaris*. Por lo tanto, se recomienda la aplicación temprana de este hongo en suelos contaminados, con el fin de establecer en ellos una colonización efectiva y prevenir la proliferación de patógenos, especialmente en sistemas agrícolas con suelos comprometidos por contaminantes o altos niveles de infección.

Se sugiere desarrollar estudios a largo plazo para evaluar la sostenibilidad de *Trichoderma* sp. en el control de patógenos, en ese sentido, es determinante evaluar la efectividad de *Trichoderma* sp. en condiciones de campo. así que, realizar estudios adicionales sobre la persistencia de *Trichoderma* sp. en suelos agrícolas resulta recomendable, ya que permitirá optimizar su aplicación y garantizar su efectividad como una solución sostenible en el manejo de enfermedades en diversos contextos agrícolas.

Se recomienda el uso de técnicas de tinción como el azul de lactofenol para la observación microscópica de hongos en estudios futuros. Esta técnica permite una visualización clara de estructuras como hifas, conidios y esporas, facilitando su identificación y caracterización morfológica. Además, su aplicación es sencilla y económica, lo que la convierte en una alternativa eficiente para complementar los análisis microbiológicos y mejorar la precisión en la identificación de hongos fitopatógenos.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altieri M. A y Nicholls C. I. 2013. The adaptation and mitigation potential of traditional agriculture in a changing climate. *Clim Chang.* doi:10.1007/s10584-013-0909-y
- Altieri, M. A., & Nicholls, C. I. 2018. Agroecología y cambio climático: ¿adaptación o transformación?. *Revista de Ciencias Ambientales*, 52(2), 235-243. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7094648>
- Altieri, M. A., Nicholls C. I., Henao A. y Lana M. A. 2015. Agroecology and the design of climate change-resilient farming systems. *Agronomy for Sustainable Development* 35: 869-890. doi: 10.1007/s13593-015-0285-2
- Amaya Lema, J. N. 2021. *Evaluación de la capacidad degradadora de Trichoderma sp. y Aspergillus sp. en bagazo de caña de azúcar*. [Tesis de grado, Riobamba, Universidad Nacional de Chimborazo]. Repositorio institucional de la Unach. <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/8388>
- Andrade-Hoyos, P., Luna-Cruz, A., Osorio-Hernández, E., Molina-Gayosso, E., Landero-Valenzuela, N., & Barrales-Cureño, H. J. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(6), 1259-1272. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342019000601259&script=sci_arttext
- Andrade-Hoyos, P., Rivera-Jiménez, M. N., Landero-Valenzuela, N., Silva-Rojas, H. V., Martínez-Salgado, S. J., & Romero-Arenas, O. 2023. Beneficios ecológicos y biológicos del hongo cosmopolita *Trichoderma* spp. en la agricultura: una perspectiva en el campo mexicano. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(4), 366-377. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754123000603>

- Arana-Gabriel, Y., Burrola-Aguilar, C., Garibay-Orijel, R., & Franco-Maass, S. 2014. Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 20(3), 213-226. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rcscfa/v20n3/v20n3a6.pdf>
- Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., & Peña-Cabriales, J. J. 2009. el género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(4), 257-269. <http://www.redalyc.org/pdf/370/37012013006.pdf>
- Aristizabal, M. A. R., Hernández, G. S. H., & Riaño, P. A. B. 2022. Perspectivas en Biorremediación para la recuperación de suelos salinos” ectivas en Biorremediación para la recuperación de suelos salinos. *Revista Guarracuco sostenible*, 1(1). <http://publicaciones.unimeta.edu.co/index.php/guarracucosostenible/articulo/view/463>
- Arranz, X. C., Escudero, A., & Ros, F. V. 2022. *La salud planetaria*. Los Libros de La Catarata. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Sad2EAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT3&dq=la+complejidad+de+los+ecosistemas+del+suelo+es+capaz+de+facilitar+la+coexistencia+de+estos+microorganismos+sin+que+se+produzca+una+alteraci%C3%B3n+importante+de+las+cargas+de+pat%C3%B3genos+vegetales&ots=84PU5W8SdN&sig=pdK-1jyX5yXTxGmivXOIMEEzZLs#v=onepage&q&f=false>
- Arroyo, W. F. V., Torres, C. M. T., Salinas, A. A. M., Santillán, D. F. N., Rivera, L. A. M., Párraga, A. G. D., . & Jackson, T. 2020. Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus

beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7891239>

Asamblea Nacional del Ecuador. 2012. *Ley de Sanidad Agropecuaria*. Registro Oficial Suplemento 71. https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/Documento_Ley%20Orgánica%20de%20Sanidad%20Agropecuaria.pdf

Asamblea Nacional del Ecuador. 2017. Código Orgánico del Ambiente. https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/01/CODIGO_ORGANICO_AMBIENTE.pdf *Ley de Ambiente*. Registro Oficial Suplemento 346.

Bayer. (s.f). *Marchitez del chile*. Vegetables México. Recuperado el 8 de noviembre de 2024, de <https://www.vegetables.bayer.com/mx/es-mx/recursos/agronomic-spotlights/marchitez-del-chile.html#:~:text=%C2%BB%20La%20marchitez%20del%20chile%20causada%20por,la%20aplicaci%C3%B3n%20de%20fungicidas%20cuando%20sea%20necesario>.

Bedoya Castañeda, D. C. 2022. *Hongos patógenos del grano/semilla de arroz (Oryza sativa) asociados al manchado: Alternativas sustentables de control*. [Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina]. Repositorio institucional de la unlp. <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/154055>

Berumen, F. D. 2017. *Caracterización de aislados del hongo Metarhizium provenientes del sur del estado de Guanajuato con potencial de promover el crecimiento vegetal*. [Tesis de maestría. Universidad de Guanajuato, México]. Repositorio institucional de la Ugto. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/377>

- Bejarano, E. V. R., Flanagan, N. S., Lespiaucq, A. V., & Espinosa, A. T. M. 2024. *Guía práctica: implementación de metodologías para el aislamiento, preservación y uso de hongos micorrízicos de orquídeas*. Sello Editorial Javeriano-Pontificia Universidad Javeriana, Cali. [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=0_sBEQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA7&dq=Para+inocular+los+suelos+se+prepar%C3%B3+un+medio+de+cultivo+1%C3%ADquido+de+caldo+de+papa+dextrosa,+hirviendo+8+gr+de+papa+y+a%C3%B1adiendo+20+gr+de+dextrosa+en+un+\(1\)+litro+de+agua&ots=bxbnYxzJr2&sig=7MM9BHcVDigVviAkDKrejCGL1DQ#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=0_sBEQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA7&dq=Para+inocular+los+suelos+se+prepar%C3%B3+un+medio+de+cultivo+1%C3%ADquido+de+caldo+de+papa+dextrosa,+hirviendo+8+gr+de+papa+y+a%C3%B1adiendo+20+gr+de+dextrosa+en+un+(1)+litro+de+agua&ots=bxbnYxzJr2&sig=7MM9BHcVDigVviAkDKrejCGL1DQ#v=onepage&q&f=false)
- Cardona, R., & Suleima Gonzáles, M. 2008. *Caracterización y patogenicidad de hongos del complejo helminthosporium asociados al cultivo del arroz en Venezuela* [Nota técnica]. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA).
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C. & Mahillon, J. 2019. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10, 302. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Chávez Centeno, V. 2023. *Eficiencia de los biocontroladores en el control del mildiu (*Peronospora variabilis*) en la producción orgánica de quinua (*Chenopodium quinoa*) en la EE Canaán UNSCH 2763 msnm*. [Tesis de maestría. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Perú]. Repositorio institucional de la UNSH. <https://repositorio.unsch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/23f4f74d-36be-4102-a80c-b5a8350c0835/content>
- Chávez, Á. C., Sánchez, G. J. L., Valenzuela, B. L., Peña, H. B., & Espinoza, R. M. L. 2022. Actividad *in vitro* de *Trichoderma asperellum* para el control biológico de fitopatógenos de suelo. *Phytoma España: La revista*

profesional de sanidad vegetal, (339), 35-43.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8437551>

Companioni González, B., Domínguez Arizmendi, G., & García Velasco, R. 2019.

Trichoderma: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal*, 19(4), 237-248.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2074-86472019000400237&script=sci_arttext

Constitución de la República del Ecuador. 2008. Decreto Legislativo 0, Registro

Oficial 449 de 20-oct-2008. Última modificación: 13-jul-2011.

https://www.oas.org/juridico/pdfs/mesicic4_ecu_const.pdf

Cortés-Hernández, F. D. C., Alvarado-Castillo, G., & Sánchez-Viveros, G. 2023.

Trichoderma spp., una alternativa para la agricultura sostenible: una revisión. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 25(2), 73-87.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752023000200073&script=sci_arttext

Díaz, J. F. M., Granthon, M. E. I., Carbajal, C. Ñ., Cruz, L. D. R., Manchay, R. D.,

& Vásquez, J. A. M. 2020. Evaluación del índice mitótico de meristemas radiculares de *Allium cepa* “cebolla” expuestos a diferentes concentraciones de metotrexato. *Medicina naturista*, 14(2), 117-122.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7512770>

Díaz, I. F. 2020. Importancia de la fitopatología en la seguridad e inocuidad

alimentaria: Revisión de Literatura.

<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/b48d113d-efa2-47a8-b52f-0265e48a3489/content>

Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley,

C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V., & Kubicek, C. P. 2011. Trichoderma: The Genomics of Opportunistic

Success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749-759.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>

Durand Paz, J. H., & Tello Galarreta, F. A. M. 2019. Efecto del pH y la concentración de melaza como estimulante de *Trichoderma* sp. para la reducción de Cromo en efluentes de la etapa de curtido.
<https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/49395>

EPPO Global Database. 2020a. *Fusarium*. <https://gd.eppo.int/taxon/1FUSAG>

EPPO Global Database. 2020b. *Botrytis*. <https://gd.eppo.int/taxon/COCHCL>

EPPO Global Database. 2020c. *Bipolaris*. <https://gd.eppo.int/taxon/COCHCL>

Escarsena, E. P. 2024. Análisis de la Técnica de la Adición de la Urea en la Remediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos de la Ciudad de Juliaca–2022. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 8(1), 6990-7010.
<https://www.ciencialatina.org/index.php/cienciala/article/view/10055>

Flathman, P. E., & Lanza, G. R. 1998. Phytoremediation: Current views on an emerging green technology. *Journal of Soil Contamination*, 7(4), 415-432.
<https://doi.org/10.1080/10588339891334438>

Gambini Valverde, L. R. 2020. Métodos de remediación de suelos contaminados por actividades mineras.
<https://repositorio.cientifica.edu.pe/handle/20.500.12805/1478>

Ganchala Tierra, C. V. 2024. *Eficacia de Trichoderma Spp. para en el control de nématodos fitoparásitos en el cultivo de Alstromeria*. [Tesis de maestría, Universidad Estatal del Milagro, Ecuador]. Repositorio institucional de la UNEMI. <https://repositorio.unemi.edu.ec/handle/123456789/7405>

- Gavilánez López, C. F. 2023. Determinación de metales pesados en la cobertura vegetal de suelos agrícolas en las parroquias: La Matriz y San Felipe de Rumipamba Quero-2023. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/22113>
- Gómez Pibaque, M. J., & Buri Cabrera, B. S. 2023. *Trichoderma* spp: efectos de aplicaciones edáficas en variables agronómicas durante las fases fenológicas del cultivo de banano. [Tesis de maestría, Universidad Técnica de Machala]. Repositorio institucional de la Utmachala. <https://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/23498>
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. 2023. *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25(1), 1-14. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=113132>
- Grados Moreyra, N. J. 2024. *Antagonismo in vitro de Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* sp. y *Fusarium* sp., aislados de *Fragaria ananassa* "fresa". Ayacucho-2022. [Tesis de grado, Universidad Nacional Autónoma de Chota, Perú]. Repositorio institucional de la UNSCH. <https://repositorio.unsch.edu.pe/server/api/core/bitstreams/582c3cbf-5e8b-4bb9-974a-ec12a2aeb97f/content>
- Guerrón, M. A. J., & Daniela, É. 2018. *Pruebas de sensibilidad de dos fungicidas Unisitio para el control de Botrytis* sp. en el cultivo de rosa. [Tesis de grado. Universidad central del Ecuador. Quito]. Repositorio institucional de la UCE. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/16094/1/T-UCE-0001-CAG-017.pdf>
- Guerrero, G. T., & Meléndez, V. E. P. 2023. Microbiota asociada a plantaciones agroforestales de cacao y su impacto en la tolerancia al estrés

abiótico. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(1).
<https://ojs.unipamplona.edu.co/index.php/rcyta/article/view/2877>

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. 2004. Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>

Hernández, C. E. O. 2021. El potencial de la biorremediación. *Herreriana*, 2(2), 30-33.
<https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/herreriana/article/view/6285>

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal science, ahead*, 0. <https://doi.org/10.4067/s0719-38902019005000205>

Hernández-Rodríguez, A., Ruíz-Beltrán, Y., Acebo-Guerrero, Y., Miguélez-Sierra, Y., & Heydrich-Pérez, M. 2014. Antagonistas microbianos para el manejo de la pudrición negra del fruto en Theobroma cacao L: estado actual y perspectivas de uso en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 29(1), 11-19. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522014000100002&script=sci_arttext&tlng=en

Hidalgo, D., y Tello, C. 2022. Manual para la producción de hongos entomopatógenos y análisis de calidad de bioformulados. Manual N° 128. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santo Domingo. La Concordia, Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. 35 p.

- Hidalgo, J. 2017. *La situación actual de la sustitución de insumos agroquímicos por productos biológicos como estrategia en la producción agrícola* [Tesis de Maestría. Universidad Andina Simón Bolívar, Quito, Ecuador]. Repositorio institucional de la UASB. <https://repositorio.uasb.edu.ec/handle/10644/6095>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14-21. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext
- López, A. C., Alvarenga, A. E., Zapata, P. D., Luna, M. F., & Villalba, L. L. 2020. Aislamiento e identificación de hongos asociados a *lex paraguariensis* St. Hil. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (33), 1-10. https://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851-75872020000100003&script=sci_arttext
- López, E., Cisneros, S., & Ochoa, J. 2016. Procesos de bioestimulación para la remediación de suelos agrícolas contaminados con tebuconazol y λ -cialotrina. *Revista de simulación y Laboratorio*, 3(8), 1-9. https://www.researchgate.net/profile/Erick-Lopez-7/publication/339313460_Procesos_de_bioestimulacion_para_la_remediacion_de_suelos_agricolas_contaminados_con_tebuconazol_y_l-cialotrina/links/5e4ad6a492851c7f7f43c6c3/Procesos-de-bioestimulacion-para-la-remediacion-de-suelos-agricolas-contaminados-con-tebuconazol-y-l-cialotrina.pdf
- Lorenzo, M. E. 2004. Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp. *Fitosanidad*, 8(2), 64. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209117836021.pdf>

Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. 2015. The genus *Bipolaris*. *Studies in mycology*.

<https://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/wfbi/01660616/v79n1/s8.pdf?expires=1730762510&id=0000&titleid=75011901&checksum=EF745DA4DB71C4EB925E66D7F33CE266&host=https://www.ingentaconnect.com>

Martínez, A. M. 2012. *Evaluación y selección de cepas de Trichoderma Sp. para control biológico de Fusarium sp. en maracuyá (Passiflora edulis, variedad. flavicarpa) en condiciones in vitro* [Universidad Técnica de Ambato].

<https://repositorio.uta.edu.ec/server/api/core/bitstreams/aea02f49-2edf-45a4-bf3a-e4be2bdbb17a/content>

Medina, N. B., Sagnay-Ramírez, B., & Leon-Reyes, A. 2024. Memorias del VI Simposio en Fitopatología, Control Biológico e Interacciones Planta-Patógeno. *Archivos Académicos USFQ*, (51). <https://revistas.usfq.edu.ec/index.php/archivosacademicos/article/view/3308>

Mendarte-Alquisira, C., Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R. (2021). Fitorremediación: Alternativa biotecnológica para recuperar suelos contaminados con DDT. Una revisión. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-888X2021000100204&script=sci_arttext

Mesa-Vanegas, A. M., Marín, A., & Calle-Osorno, J. 2019. Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas

agrícolas. *Actualidades biológicas*, 41(111), 32-44.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-35842019000200032&script=sci_arttext

Ministerio del Ambiente Perú. (2013). Guía para el muestreo de suelos. *Ministerio del Ambiente*. <https://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2013/10/GUIA-PARA-EL-MUESTREO-DE-SUELOS-final.pdf>

Molano, K. D. S., & Tapia, L. V. 2023. Una propuesta de análisis sistémico para la selección de tecnologías para remediación de suelos a partir de un análisis multicriterio. *Ingeniería y Región*, 29, 5-19.
<https://www.journalusco.edu.co/index.php/iregion/article/view/3964>

Morcuende Herrero, J. 2024. Estudio y desarrollo de bio-inoculante basado en *Trichoderma* spp. en semilla de garbanzo de Fuentesauco (IGP) para el control efectivo de la rabia (*Ascochyta rabiei*, Pass).
<https://uvadoc.uva.es/handle/10324/69515>

Mota, R. M. A., Cruz, J. R. C., Castellanos, B. H., & de la Cruz Elizondo, Y. 2024. Bioprospección de hongos filamentosos en suelos contaminados con hidrocarburos en Villa Hermosa, Álamo, Veracruz. *Revista Aristas*, 11(19), 23-28.
http://revistaaristas.tij.uabc.mx/index.php/revista_aristas/article/view/334

Nature, I. (2022, 28 junio). *Botrytis: causas, daños y soluciones*. Idai Nature, Líderes En Biocontrol Agrícola.
<https://www.idainature.com/noticias/biocontrol-agricola/botrytis-causas-danos-y-soluciones/>

Nehra, S., Gothwal, R. K., Dhingra, S., Varshney, A. K., Solanki, P. S., Meena, P., ... & Ghosh, P. 2022. Mechanism of antagonism: hyperparasitism and

antibiosis. *In Microbial Biocontrol: Sustainable Agriculture and Phytopathogen Management: Volume 1* (pp. 257-277). Cham: Springer International Publishing. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-87512-1_11

Núñez Cano, J. I. 2024. Papel beneficioso que determinados microorganismos rizosféricos del suelo (bacterias, hongos y levaduras) ejercen sobre la adquisición de hierro, fósforo y otros elementos en plantas de arroz. <https://helvia.uco.es/handle/10396/26459>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2020. *The state of the world's land and water resources for food and agriculture: Managing systems at risk*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2017. *Conservación del Suelo y Agricultura/Portal de Suelos de la FAO*. <https://www.fao.org/soils-portal/soil-biodiversity/conservacion-del-suelo-y-agricultura/es/>

Paul, E., & Frey, S. (Eds.). 2023. *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Elsevier. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=89LKEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=soil+microbiology+ecology+and+biochemistry&ots=1xxlCshhFd&sig=1hDRkcG7Vivy-M-VaSX_78rn9GE#v=onepage&q=soil%20microbiology%20ecology%20and%20biochemistry&f=false

Pegoraro, V., Bachmeier, O., Lorenzon, C., Conde, B., Ortiz, J., Barbosa, A., & Zubillaga, M. 2023. Cambios en los atributos del suelo por aplicación continua de efluente porcino. *Ciencia del suelo*, 41(2), 261-272. https://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1850-20672023000200261&script=sci_arttext

- Perniola, O. S., Isabel Noelting, M. C., Chorzempa, S. E., Aulicino, M. B., Martín Mantz, G., & Astiz Gassó, M. M. 2024. Sinergia entre la biofumigación con mostaza india y el hongo antagonista *Trichoderma harzianum* para el control de *Phomopsis* spp., bajo condiciones *in vitro*. *Siembra*, 11(2). http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2477-88502024000300002
- Quintanilla Villegas, C. V., & Reyes Bonilla, J. M. 2023. *Efectividad de Bacillus subtilis Cohn (1872) y Trichoderma harzianum Rifai (1969) sobre Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder & Hansen, en semillas de tomate (Solanum lycopersicum var. CENTA CUSCATLÁN)* [Tesis Doctoral, Universidad de El Salvador]. Repositorio institucional de la US. <https://oldri.ues.edu.sv/id/eprint/32790/>
- Ramos, E., & Zúñiga, D. 2008. EFECTO DE LA HUMEDAD, TEMPERATURA y PH DEL SUELO EN LA ACTIVIDAD MICROBIANA a NIVEL DE LABORATORIO. *Ecología Aplicada*. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v7n1-2/a15v7n1-2.pdf>
- Rodríguez-García, D., & Vargas-Rojas, J. 2022. Efecto de la inoculación con *Trichoderma* sobre el crecimiento vegetativo del tomate (*Solanum lycopersicum*). *Agronomía Costarricense*, 46(2), 47-60. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242022000200047
- Rojas Badía, M. M., Sánchez Castro, D., Rosales Perdomo, K., & Lugo Moya, D. 2017. Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2), 00-00. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v32n2/rpv05217.pdf>
- Torres-Torres, L., Espinel-Correal, C., & Santos-Díaz, A. M. 2020. Hospederos alternativos y estandarización de métodos para evaluar la actividad

biocontroladora de micoinsecticidas. *Revista Colombiana de Entomología*, 46(2). http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-04882020000200002&script=sci_arttext

Torres, E. J. P., Virelles, P. M., Cabrera, A. B., Mora, M. L., Rivero, G. G., Caisa, L. P. L., ... & Reyes, O. M. C. 2013. Antagonismo “*in vitro*” de *Trichoderma harzianum* sobre aislados camagueyanos de *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae*. *Centro Agrícola*, 40(3), 29-36. https://www.researchgate.net/profile/Ernesto-Juniors/publication/323103945_Antagonismo_in_vitro_de_Trichoderma_harzianum_sobre_aislados_camagueyanos_de_Bipolaris_oryzae_y_Sarocladium_oryzae/links/5a7f0d91a6fdcc0d4baa6543/Antagonismo-in-vitro-de-Trichoderma-harzianum-sobre-aislados-camagueeyanos-de-Bipolaris-oryzae-y-Sarocladium-oryzae.pdf

Vallejo-Quintero, V. E. 2013. Importancia y utilidad de la evaluación de la calidad de suelos mediante el componente microbiano: experiencias en sistemas silvopastoriles. *Colombia forestal*, 16(1), 83-99. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-07392013000100006&script=sci_arttext

Vásquez-Ramírez, L. M., & Castaño-Zapata, J. 2017. Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SACC.) WC SNYDER & HN HANSEN]: una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20(2), 363-374. <https://doi.org/10.31910/rudca.v20.n2.2017.394>

Villegas, M.A. 2005. *Trichoderma Pers.* Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. 2005. *Orius Biotecnología*. Colombia. Disponible en: [http:// www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,66,0,0,1,0](http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,66,0,0,1,0).

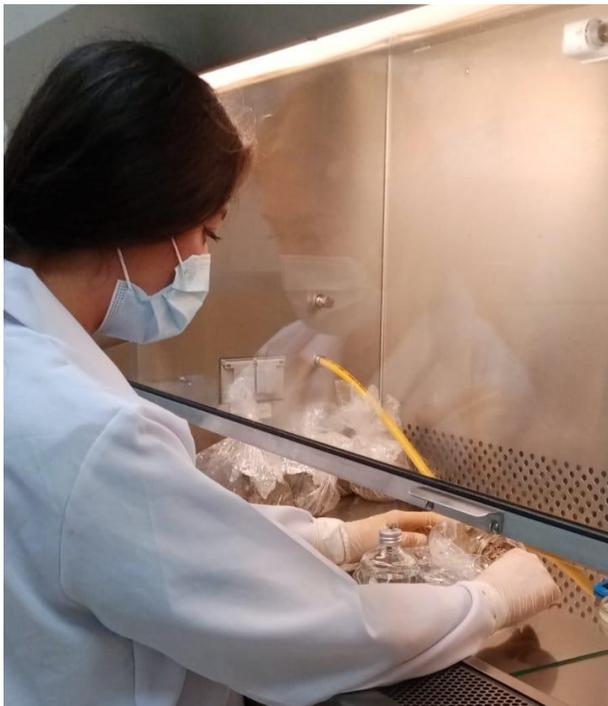
- Vives, M. J. 2013. Expresión de genes asociados con patogenicidad en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* durante procesos de biorremediación de hidrocarburos del petróleo. [Informe Técnico]. Universidad de los Andes.
- Yáñez, F. 2019. *Implicaciones ambientales y sociales del uso y manejo de agroquímicos en la producción de maíz suave en la Provincia de Bolívar. Estudio de caso: Recinto Achupallas, Cantón San Miguel*. [Tesis de grado, Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales, Quito] Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales, FLACSO Ecuador.
- Zubieta, F. M. A., Sánchez, B. M., & Pinedo, M. N. 2022. Crecimiento *in vitro* de hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) en diferentes medios de cultivo: Félix Miguel Angulo Zubieta, Beatriz Mamani Sánchez, Máximo Nova Pinedo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 9(1), 14-22.
<https://riiarn.umsa.bo/index.php/RIIARn/article/view/216>

4. ANEXOS

Anexo A. Modelo de trampas empleadas en la investigación.



Anexo B. Aislamiento de microorganismos a partir de las muestras recolectadas



Anexo C. Confrontación *in vitro* de Trichoderma sobre Fusarium



Anexo D. Confrontación *in vitro* de Trichoderma sobre Botrytis



Anexo E. Confrontacion *in vitro* de Trichoderma sobre Bipolaris



Anexo F. Masetas etiquetadas de acuerdo al tratamiento.



Anexo G. Cámaras para ensayo de suelos.



Anexo H. Resultados de la prueba de normalidad de Anderson Darling primer ensayo de confrontación *in vitro*.

| | Tratamientos | | |
|----------------------|---------------------|--------|--------|
| Anderson - Darling A | 0,5397 | 0,4012 | 0,4012 |
| P (normal) | 0,1171 | 0,2824 | 0,2824 |

Anexo I. Resultados del ANOVA de una sola vía primer ensayo.
Test for equal means

| | Sum of sqrs | Df | Mean square | F |
|------------------------|--------------------|-----------|--------------------|----------|
| Between groups: | 112,09 | 2 | 56,0448 | 0,114 |
| Within groups: | 11802,8 | 24 | 491,784 | |
| Total | 11914,0 | 26 | | |

Components of variance (only for random effects):

| | | | | | |
|--------------------|----------|--------------------|---------|------------|-----------|
| Var(group): | -48,4155 | Var(error): | 491,784 | ICC | -0,109199 |
|--------------------|----------|--------------------|---------|------------|-----------|

Omega²: 0

| | | |
|--|------------------|--------|
| Levene's test for homogeneity of variance, from means | P (same): | 0,6986 |
|--|------------------|--------|

| | | |
|------------------------------------|------------------|--------|
| Levene's test, from medians | P (same): | 0,6935 |
|------------------------------------|------------------|--------|

Welch F test the case of unequal variances: $F = 0,09407, df = 15, 85, p = 0,9107$

Anexo J. Resultados de la prueba de normalidad de Anderson Darling segundo ensayo.

| | Tratamientos | | |
|----------------------|---------------------|--------|--------|
| Anderson - Darling A | 0,3857 | 0,2085 | 0,2547 |
| P (normal) | 0,3105 | 0,8021 | 0,3647 |

Anexo K. Resultados del ANOVA de una sola vía segundo ensayo.

| Test for equal means | | | | | |
|-----------------------------|--------------------|-----------|--------------------|---------------|---------------------------------|
| | Sum of sqrs | Df | Mean square | F | P (same) |
| Between groups: | 123,5 | 2 | 61,75 | 0,3438 | 0,7125 |
| Within groups: | 4310,39 | 24 | 179,599 | | Premutation p (n =99999) |

| | | | | |
|--|-----------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Total: | 4433,89 | 26 | | 0,7118 |
| Components of variance (only for random effects): | | | | |
| Var (group): | -13,0944 | Var(error): | 179,599 | ICC |
| Omega²: | 0 | | | -0,0786426 |
| Levene's test for homogeneity of variance, from means | | P (same): | 0,4475 | |
| Levene's test, from medians | | P (same): | 0,5999 | |
| Welch F test the case of unequal variances: | | | F =0,3609, df=15,61, p =0,7027 | |

Anexo L. Resultados de la prueba de normalidad de Anderson Darling de PICR.

| | Tratamientos | | |
|--------------------|---------------------|---------|---------|
| Anderson-Darling A | 0,1907 | 0,424 | 0,4767 |
| P (normal) | 0,6247 | 0,09729 | 0,06211 |

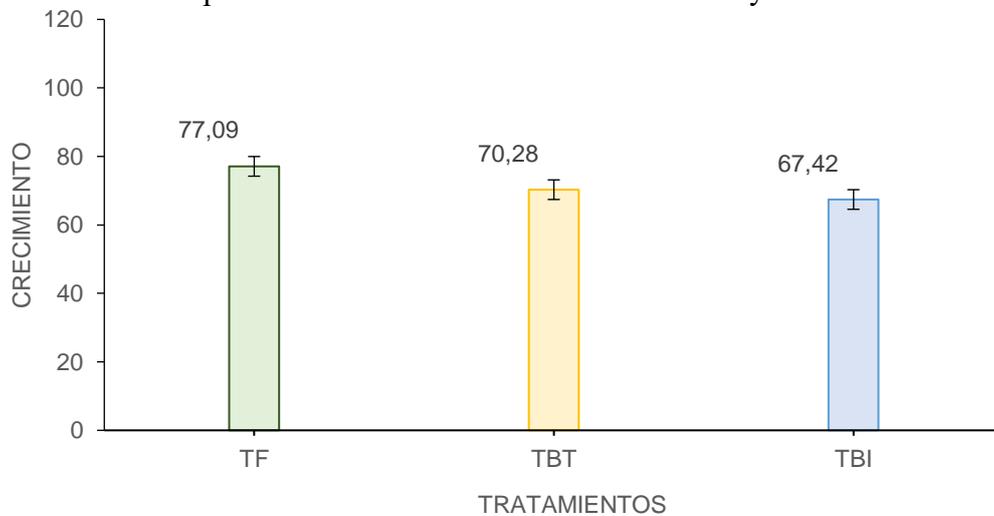
Anexo M. Resultados del ANOVA de una sola vía de PICR.

| Test for equal means | | | | | |
|-----------------------------|--------------------|-----------|--------------------|--------------|---------------------------------|
| | Sum of sqrs | Df | Mean square | F | P (same) |
| Between groups: | 148,091 | 2 | 74,0455 | 1,029 | 0,4129 |
| Within groups: | 431,821 | 6 | 71,9702 | | Premutation p (n =99999) |
| Total: | 579,912 | 8 | | | 0,4776 |

Components of variance (only for random effects):

| | | | | | |
|--|-----------------|------------------|--------------|--------------|------------|
| Var (group): | 0,691767 | Var(error): | 71,9702 | ICC | 0,00952034 |
| Omega²: | 0,006367 | | | | |
| Levene's test for homogeneity of variance, from means | | P (same): | 0,4914 | | |
| Levene's test, from medians | | P (same): | 0,6093 | | |
| Welch F test the case of unequal variances: | | | $F = 0,7491$ | $df = 3,661$ | $p = 5337$ |

Anexo N. Comparación de resultados de ANOVA en ensayo de PICR.



Anexo O. Ficha técnica caracterización macro y microscópica de *Fusarium* sp.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS

Nombre: *Fusarium* sp.



| | | |
|---------|---------|------------------|
| Color | anverso | Centro: Amarillo |
| | | Medio: Crema |
| | | Anillo: Blanco |
| | | Borde: Crema |
| Textura | | Algodonosa X |
| | | Polvosa |

| | | | |
|---------------------|------------------|-----------|---|
| | Aspecto | Irregular | |
| | | Radiado | X |
| Altura del micelio | <u>Alto</u> | | |
| | <u>Medio</u> | | |
| | <u>Bajo</u> | X | |
| Tipo de crecimiento | <u>Irregular</u> | | |
| | <u>Denso</u> | | |
| | <u>Regular</u> | X | |
| | Tenue | | |

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

Nombre: *Fusarium* sp.

Micelio



Esporas

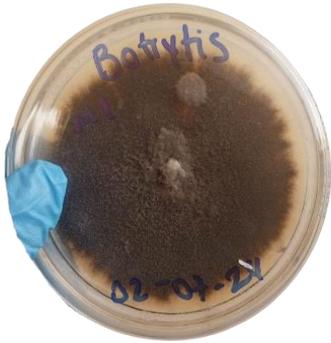


| | | | | | |
|--------------|--------------------|---|-------------------------|----------------------|--|
| Hifas | <u>Septadas</u> | X | Esporas | <u>Ascosporas</u> | |
| | <u>No septadas</u> | | | <u>Basidiosporas</u> | |
| | | | <u>Conidios</u> | X | |
| | | | <u>Esporangiosporas</u> | | |

Anexo P. Ficha técnica caracterización macro y microscópica de *Botrytis* sp.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS

Nombre: *Botrytis* sp.



| | | | |
|---------------------|---------|---------------------|---|
| Color | anverso | Centro: Café claro | |
| | | Medio: Café claro | |
| | | Anillo: Café Oscuro | |
| | | Borde: Crema | |
| Textura | | Algodonosa | |
| | | Aterciapelado | X |
| Aspecto | | Irregular | |
| | | Radiado | X |
| Altura del micelio | | Alto | |
| | | Medio | |
| | | Bajo | X |
| Tipo de crecimiento | | Irregular | |
| | | Denso | |
| | | Regular | X |
| | | Tenue | |

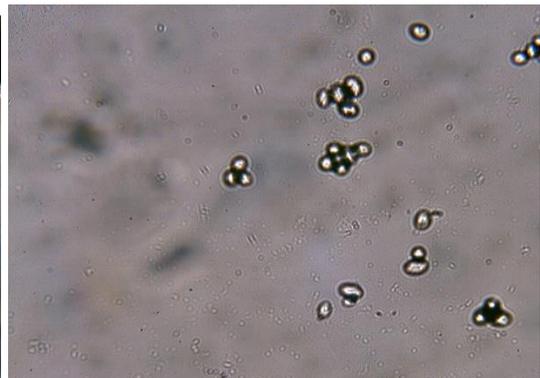
CARACTERISTICAS MICROSCÓPICAS

Nombre: *Botrytis* spp.

Micelio



Esporas



| | | | | | |
|--------------|--------------------|----------|----------------|-------------------------|----------|
| Hifas | <u>Septadas</u> | <u>X</u> | Esporas | <u>Ascosporas</u> | |
| | <u>No septadas</u> | | | <u>Basidiosporas</u> | |
| | | | | <u>Conidios</u> | <u>X</u> |
| | | | | <u>Esporangiosporas</u> | |

Anexo Q. Ficha técnica caracterización macro y microscópica de *Bipolaris* sp.

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS

Nombre: *Bipolaris* spp.

| | | | | |
|--|--------------|---------|---------------------|---|
|  | Color | anverso | Centro: Blanco | |
| | | | Medio: Crema | |
| | | | Anillo: Café Oscuro | |
| | | | Borde: Crema | |
| Textura | | | Algodonosa | X |
| | | | Polvosa | |
| Aspecto | | | Irregular | |
| | | | Radiado | X |
| Altura del micelio | | | <u>Alto</u> | |
| | | | <u>Medio</u> | |
| | | | <u>Bajo</u> | X |
| Tipo de crecimiento | | | <u>Irregular</u> | |
| | | | <u>Denso</u> | |
| | | | <u>Regular</u> | X |
| | | | <u>Tenue</u> | |

CARACTERISTICAS MICROSCÓPICAS

Nombre: *Bipolaris* spp.

Micelio**Esporas**

| | | |
|----------------------|-------------------------|----------|
| Hifas | <u>Septadas</u> | <u>X</u> |
| | <u>No septadas</u> | |
| <hr/> Esporas | | |
| | <u>Ascosporas</u> | |
| | <u>Basidiosporas</u> | |
| | <u>Conidios</u> | <u>X</u> |
| | <u>Esporangiosporas</u> | |

Anexo R. Permiso de ejecución de trabajo practico en el laboratorio de agrobiotecnología IASA I Oficio Nro. ESPE-REC-2024-0326-O



Oficio Nro. ESPE-REC-2024-0326-O

Sangolquí, 09 de mayo de 2024

Asunto: Respuesta a solicitud para desarrollo de trabajo de Titulación Srta. Samantha Cañar

Biólogo

Richard Gonzalo Duque Marín, Mgtr.

Decano Facultad de Ciencias del Mar

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

En su Despacho

De mi consideración:

Reciba un cordial y atento saludo de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

En atención al oficio N° UPSE-FCM-057-OF-2023 del 29 de abril de 2024 adjunto me permito remitir a usted, señor Decano, el memorando No. ESPE-DCVA-2024-1445-M emitido por el director del departamento de Ciencias de la Vida, con el cual se acepta la solicitud de la señorita Cañar Silva Samantha Poleth, con C.I. 1750982553, para que ejecute el componente práctico de su trabajo de titulación en el Laboratorio de Agrobiotecnología de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I; por lo que mucho agradeceré se digne poner en conocimiento de la mencionada señorita estudiante.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Cml. C.S.M. Víctor Emilio Villavicencio Álvarez, PhD.

RECTOR

Referencias:

- ESPE-DCVA-2024-1445-M

Anexos:

- Convenio UPSE-ESPE.pdf

- Correo de espe.edu.ec - Solicitud información para desarrollo de trabajo de Titulación_.pdf

- OFICIO N° UPSE-FCM-057-OF-2024-signed.pdf

- ESPE-DCVA-2024-1445-M.pdf

Copia:

Licenciado

Rachid Seqqat, PhD. (Dir.)

Director del Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Sede Matriz – Sangolquí Av. General Rumiñahui S/N, Sector Santa Clara - Valle de los Chillos

Teléfono: (593) 02-3989400

e-mail:causuario@espe.edu.ec - website:www.espe.edu.ec