



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

**“EVALUACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE CO-ENCAPSULACIÓN DE
Trichoderma spp. CON MICRONUTRIENTES PARA EL CONTROL
BIOLÓGICO DE *Moniliophthora roreri*”.**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Magíster en Biociencias
Aplicadas con Mención en Biodescubrimiento**

Presentado por: Rodrigo José Ludeña Tandazo

Guayaquil – Ecuador

2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, CIBESPOL por apoyar esta investigación. Al programa conjunto de postgrados VLIR NETWORK ECUADOR dentro del cual se realizó la presente investigación y por el apoyo económico brindado. A todos los docentes de la maestría en Biociencias Aplicadas, por sus valiosas enseñanzas impartidas. Al Ph.D. Luis Galarza, director de tesis por el apoyo constante, al comité evaluador y a todas aquellas personas que contribuyeron en el desarrollo de esta tesis.

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por acompañarme siempre y permitirme lograr mis metas. A mi padre por su ejemplo, consejos de vida y su apoyo incondicional. A mi madre quien está en el cielo, a quien dedico este logro que no es solo mío sino suyo también. A mi hermano por enseñarme lo que significa dedicación y amor por la profesión y a todos aquellos profesionales que dedican su tiempo a impulsar el desarrollo de la ciencia e investigación.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



María Isabel Jiménez Ph.D.
PRESIDENTA DEL COMITÉ EVALUADOR



Luis Galarza Romero, Ph.D.
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN



Jonathan Coronel León Ph.D.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 1



Milton Barcos Arias Ph.D.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 2



Edwin Vera Calle Ph.D.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 3

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

Rodrigo José Ludeña Tandazo

RESUMEN

Trichoderma spp. es un microorganismo que comprende una gran cantidad de especies con distribución mundial presentes en la mayor parte de suelos templados y tropicales y que ha demostrado poseer una fuerte actividad inhibitoria frente al patógeno *Moniliophthora roreri*, el mismo que produce la enfermedad llamada moniliasis también conocida como pudrición acuosa o helada en el Ecuador, enfermedad que ocurre en las principales áreas productoras de cacao, lo que causa perjuicios económicos a los productores.

Al encapsular *Trichoderma* con nutrientes, se le provee de protección frente a condiciones adversas que prolongan su vida útil. La presente investigación busca evaluar la actividad biocontroladora de preparaciones a base de una partícula biopolimérica de alginato que encapsule al hongo *Trichoderma spp.* junto con los minerales magnesio y zinc frente al patógeno *Moniliophthora roreri*.

Se prepararon formulaciones de co-encapsulados de *Trichoderma reesei* y *Trichoderma ghanense* con magnesio y zinc a diferentes concentraciones y se determinaron las concentraciones óptimas mediante evaluación de su crecimiento en agar papa dextrosa (PDA). Una vez determinadas las concentraciones idóneas, se evaluó la actividad *in vitro* de inhibición de crecimiento (PIRGP) a los 3 días de inoculación y micoparasitismo a los 10 días, de las distintas formulaciones por el método de cultivo dual.

Las pruebas de crecimiento de las diferentes formulaciones para las dos cepas mostraron diferencias entre tratamientos ($P < 0,05$). Mediante comparación de las medias los tratamientos de los co-encapsulados que mostraron mejor desempeño fueron *T. reesei* / *T. ghanense* -Zn 800 ppm y *T. reesei* / *T. ghanense* -Mg 5000 ppm. Los ensayos de inhibición para ambas cepas mostraron una alta actividad inhibitoria (>70%) mientras que la capacidad micoparasítica fue mayor en la cepa de *T. ghanense* (grado 3-4) que en el caso de *T. reesei* (grado 1-3) demostrando que es una buena candidata para el desarrollo de agentes de control biológico. Se evaluó el efecto en invernadero de los co-encapsulados de *T. ghanense* con magnesio y zinc sobre plantas de banano (cv. 'Williams' (*Musa AAA*)) en fase 1, utilizando para este ensayo además de las preparaciones un control de solución de esporas de *T. ghanense* y un fertilizante comercial. Se observó diferencias entre los distintos tratamientos ($P < 0,05$). El tratamiento fertilizante comercial obtuvo los mejores resultados seguido del tratamiento *T. ghanense* encapsulado + Zn 800 ppm, mientras que los tratamientos *T. ghanense* + Zn 800 ppm + Mg 5000 ppm, seguido del control absoluto demostraron el menor rendimiento en comparación con las otras formulaciones.

Como conclusión general se verifica la capacidad antagonista de los encapsulados de *Trichoderma* y micronutrientes sobre el fitopatógeno *M. roreri* y su capacidad de promover mejoras en los parámetros agronómicos de las plantas, sin embargo, es necesario evaluar otras cepas y otros componentes dentro del co-encapsulado, para verificar el comportamiento y la efectividad de las mismas.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	vi
INDICE GENERAL.....	vii
ABREVIATURAS.....	ix
SIMBOLOGÍA.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE GRÁFICOS.....	xii
INDICE DE TABLAS.....	xiii
CAPITULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	1
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
1.4 MARCO TEÓRICO.....	2
1.4.1 <i>Trichoderma</i> spp.....	2
1.4.2 <i>Moniliophthora roreri</i> (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny.....	3
1.4.3 Micronutrientes.....	4
1.4.4 Zinc.....	4
1.4.5. Magnesio.....	5
1.4.6 Encapsulación de <i>Trichoderma</i> spp. en una matriz de alginato.....	5
1.4.7 Actividad Antagónica de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>M. roreri</i>	6
CAPITULO 2.....	7
METODOLOGÍA.....	7
2.1 Diseño de Experimento.....	7
2.2 Cepas de <i>Trichoderma</i>	7
2.3 Patógeno.....	7

2.4 Plantas de banano	8
2.5 Encapsulamiento	8
2.5.1 Condiciones iniciales	8
2.5.2 Co-encapsulados	8
2.6 Actividad <i>in vitro</i> para control de <i>M. royeri</i>	10
2.7 Inoculación de plantas de banano (cv. ‘Williams’ (<i>Musa AAA</i>)) fase 1 de crecimiento con co-encapsulados de <i>T. ghanense</i> . en invernadero	12
CAPITULO 3	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
3.1 Formulación idónea de encapsulados de <i>Trichoderma</i> con Zn y Mg.....	13
3.2 Actividad <i>in vitro</i> de los co-encapsulados de <i>Trichoderma</i> con magnesio y zinc para el control de <i>M. royeri</i>	17
3.3 Efecto <i>in vivo</i> sobre plantas de banano (cv. ‘Williams’ (<i>Musa AAA</i>)) de las formulaciones de zinc y magnesio co-encapsulados con <i>Trichoderma</i> spp.	23
3.3.1 Efecto individual sobre los parámetros de crecimiento de la planta de banano de la semana 1 a la semana 9.	23
3.3.2 Efecto combinado sobre los parámetros de crecimiento de la planta de banano durante la semana 9.....	27
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	30

ABREVIATURAS

CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
PIRGP	Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial de Patógenos
PDA	Potato Dextrose Agar (Agar Papa Dextrosa)
ANOVA	Análisis de Varianzas
MANOVA	Análisis Multivariante de la Varianza.

SIMBOLOGÍA

C4B	<i>Trichoderma ghanense</i>
C2A	<i>Trichoderma reesei</i>
mL	mililitro
μL	microlitro
°C	grado centígrado
cm	centímetro
mm	milímetro
pH	potencial de hidrógeno

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Trichoderma reesei</i>	3
Figura 2. <i>Moniliophthora roreri</i>	4
Figura 3. Crecimiento de <i>T. reesei</i> co-encapsulada con magnesio y zinc a diferentes concentraciones	144
Figura 4. Crecimiento de <i>T. ghanense</i> co-encapsulada con magnesio y zinc a diferentes concentraciones	166
Figura 5. Inhibición radial de formulaciones de co-encapsulados de <i>T. reesei</i> / <i>T. ghanense</i> frente a <i>M. roreri</i>	199
Figura 6. Micoparasitismo de formulaciones de co-encapsulados de <i>T. reesei</i> y <i>T. ghanense</i> frente a <i>M. roreri</i>	20
Figura 7. Actividad quitinolítica de las distintas formulaciones de <i>T. ghanense</i> co-encapsulados con magnesio y zinc	22

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Crecimiento de las diferentes formulaciones de <i>T. reesei</i> con magnesio y/o zinc	13
Gráfico 2. Crecimiento de las diferentes formulaciones de <i>T. ghanense</i> co-encapsuladas con magnesio y/o zinc.....	15
Gráfico 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de patógenos para las distintas formulaciones frente a <i>M. royeri</i>	188
Gráfico 4. Índice de micoparasitismo para las distintas formulaciones de co-encapsulados de <i>T. reesei</i> y <i>T. ghanense</i> con magnesio y zinc frente a <i>M. royeri</i>	21
Gráfico 5. Evolución de los parámetros evaluados de la semana 1 hasta la semana 9 de ensayo.....	27
Gráfico 6. Parámetros de la planta de banano evaluados en la semana 9.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentraciones ensayadas para los diferentes co-encapsulados de <i>Trichoderma</i> , zinc y magnesio.....	8
Tabla 2. Formulaciones de <i>T. reesei</i> para evaluación de crecimiento en medio PDA	9
Tabla 3. Formulaciones de <i>T. ghanense</i> para evaluación de crecimiento en medio PDA ..	9
Tabla 4. Formulaciones de co-encapsulados ensayadas para análisis de inhibición de crecimiento y capacidad micoparasítica contra <i>M.roreri</i>	11
Tabla 5. Resultados del analisis ANOVA de la semana 1 a la semana 9 para el parámetro de clorofila	23
Tabla 6. Resultados del análisis ANOVA de la semana 1 a la semana 9 para el parámetro de diámetro de pseudotallo.....	24
Tabla 7. Resultados de análisis ANOVA de la semana 1 a la semana 9 para el parámetro altura.....	25
Tabla 8. Resultado de análisis ANOVA de la semana 1 a la semana 9 para el parámetro número de hojas	26
Tabla 9. Resultados de análisis MANOVA de la semana 9 para todos los parámetros	28

CAPITULO 1

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El aumento de la demanda de alimentos a nivel mundial ha provocado el uso de una cantidad cada vez mayor de productos químicos que son empleados en la práctica agrícola (1). Sin embargo, el amplio uso de agroquímicos ha causado efectos adversos en suelos, en la calidad del agua, productos, y consecuente producción de residuos tóxicos (2). La muerte y enfermedades crónicas causadas por envenenamiento por plaguicidas suman alrededor de 1 millón de personas por año (3).

Investigaciones han demostrado que una alternativa natural a esta problemática es la generación de mecanismos basados en el control biológico (4). El hongo *Trichoderma* spp. presenta propiedades que promueven el crecimiento de las plantas (5), micoparasitismo contra patógenos (6), es coadyuvante para la absorción de nutrientes por parte de la planta (7) y mejora la capacidad de resistencia frente a ciertas enfermedades (8). Se ha evidenciado una fuerte actividad inhibitoria de cepas de *Trichoderma* spp. contra *Moniliophthora roreri* (9). Sin embargo, la disminución de la viabilidad de los agentes de biocontrol en las etapas de almacenamiento y aplicación en campo son los principales inconvenientes en las formulaciones (10). Una de las estrategias para mejorar esta situación es la formación de encapsulados. Una matriz encapsulante protege al agente de control biológico microbiano de factores de estrés bióticos y abióticos (11).

La investigación existente se ha centrado en la preparación, caracterización y evaluación de efectividad de encapsulados a base de *Trichoderma* spp. (12). Sin embargo, no se ha evaluado el efecto biocontrolador que pudiera tener una formulación de co-encapsulados a base de *Trichoderma* spp. con magnesio y zinc contra agentes fitopatógenos. La encapsulación de *Trichoderma* en una matriz de alginato ha demostrado ser un método eficaz para la liberación controlada del agente de control biológico para la protección de la planta contra patógenos (13). Asimismo, se pueden incorporar a estos encapsulados otros componentes que proveen la base necesaria para la proliferación del antagonista (12).

En la presente investigación se ha evaluado la actividad biocontroladora de preparaciones a base de una partícula biopolimérica de alginato que encapsule al hongo *Trichoderma* spp. junto con magnesio y zinc y su evaluación como agente antagónico contra el

fitopatígeno *M. royeri*. La formación del encapsulado se hace con la finalidad de generar protección a las células de *Trichoderma* spp.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biocontroladora de *Trichoderma* spp. co-encapsulada con micronutrientes contra *M. royeri*

1.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar las condiciones iniciales de encapsulación de *T. reesei* y micronutrientes (magnesio y zinc) que puedan tener un efecto significativo sobre la actividad biocontroladora de *Trichoderma* spp.
2. Analizar la actividad *in vitro* de los co-encapsulados para el control de *M. royeri*
3. Analizar el efecto *in vivo* sobre plantas de banano (cv. 'Williams' (*Musa* AAA)) de las formulaciones de magnesio y zinc co-encapsulados con *Trichoderma* spp.

1.4 MARCO TEÓRICO

1.4.1 *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* del orden *Hypocreales* (Ascomycota) comprende una gran cantidad de especies con una distribución mundial (14). Desarrollan esporas de color verde y están presentes en la mayor parte de suelos templados y tropicales. Se los encuentra en material vegetal en descomposición y en la rizosfera de las plantas. Son colonizadores altamente exitosos de sus hábitats, que se manifiesta en la utilización eficiente del sustrato disponible como en su capacidad de producción de metabolitos y enzimas antibióticos.

Trichoderma spp. son uno de los microorganismos más utilizados como agentes de control biológico y hoy en día se comercializan como ingredientes activos de biofertilizantes, bioplaguicidas, estimulantes del crecimiento y para la resistencia natural de vegetales. Este hongo posee la capacidad para proteger las plantas, mejorar el crecimiento vegetativo, actividad antagónica frente a poblaciones de patógenos en numerosas condiciones agrícolas, así como para actuar en inoculantes del suelo para aumentar la capacidad de captación de nutrientes, descomposición y biodegradación (15)(16). El proteoma de *Trichoderma* spp. en diferentes circunstancias de crecimiento e interacciones se han estudiado, y esta información

ha sido utilizada para el desarrollo de nuevos productos en base de combinaciones del hongo vivo con sus metabolitos (17)

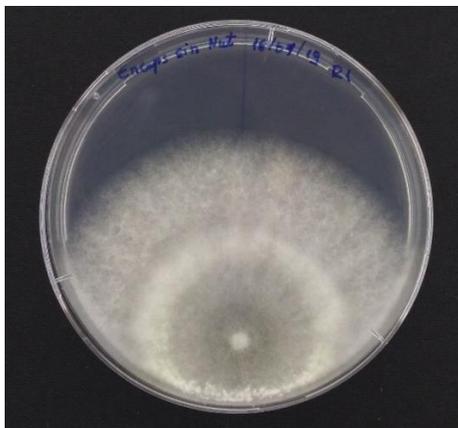


Figura 1. *Trichoderma reesei*

Fuente: Rodrigo Ludeña

1.4.2 *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny

Moniliophthora roreri (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny, es un hongo basidiomiceto, parásito de vegetales perteneciente a la familia *Marasmiaceae*. Por mucho tiempo *M. roeri* fue considerado el anamorfo de un ascomiceto; sin embargo, por medio de técnicas taxonómicas y moleculares aclararon la posición como basidiomiceto y demostraron su relación genética con el patógeno *Moniliophthora perniciosa* (18).

M. roreri produce la enfermedad llamada moniliasis también conocida como pudrición acuosa o helada en el Ecuador. Esta enfermedad ocurre en las principales áreas productoras de cacao. El hongo ataca solo el fruto de las especies de los géneros cercanos de *Herrania* y *Theobroma*, causando daño interno y externo a la vaina que resulta en pérdida total del fruto. El hongo ataca a frutos en cualquier estado de desarrollo y con mayor incidencia en los de corta edad. Los síntomas empiezan con la aparición de manchas amarillas y pardas. Luego en condiciones favorables como de humedad, se observa el crecimiento de micelio en forma de felpa blanca hasta causar putrefacción completa de la mazorca de cacao (19)

Muchos estudios concuerdan que, entre los patógenos del cacao, *M. roreri* tiene el mayor potencial de enfermedad si llega a nuevas áreas de producción (20). La

presencia de esta enfermedad en el árbol de cacao (*Theobroma cacao*) ha provocado efectos perjudiciales en el rendimiento que ha provocado perjuicios económicos incluso a largo plazo (21).



Figura 2. *Moniliophthora roreri*

Fuente: Rodrigo Ludeña

1.4.3 Micronutrientes

Los micronutrientes son elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, pero requeridas en cantidades mucho menores que los nutrientes primarios (nitrógeno, fósforo, azufre y potasio). Los micronutrientes, aunque se requieren en cantidades de trazas por las plantas, desempeñan un papel importante en una amplia gama de procesos celulares y metabólicos tales como el metabolismo energético, la regulación genética, transducciones de señales, percepción hormonal entre otros (22).

1.4.4 Zinc

El zinc constituye un componente importante de las enzimas para la síntesis de proteínas y la producción de energía y mantiene la integridad de la estructura de las biomembranas. Se ha mencionado que más de 1200 proteínas se unen, contienen o transportan Zn^{+2} , entre las que se incluyen una gran cantidad de proteínas que contienen zinc y factores de transcripción, oxidorreductasas y enzimas hidrolíticas como metaloproteasas (23). El zinc interviene de manera importante en el crecimiento de semillas de tal manera que las plantas con deficiencia de zinc muestran una madurez tardía. La mayor parte de las enzimas

de zinc están involucradas en la regulación de la transcripción de ADN, el procesamiento del ARN y la traducción. (24).

Entre algunas de las respuestas de las plantas frente a la deficiencia de zinc encontramos necrosis en el ápice de la raíz y curvatura hacia adentro de la lámina foliar, hoja moteada por clorosis intervenal, reducción en el tamaño entre otros. (22).

1.4.5. Magnesio

El magnesio constituye el octavo elemento con mayor presencia en la corteza terrestre y el segundo catión más abundante en plantas. A pesar de esto la mayor parte del magnesio del suelo (90-98%) se incorpora a la estructura de la red cristalina de los minerales y no está directamente disponible para la absorción de las plantas (25). La función más conocida del magnesio es la recolección de energía solar al ocupar la posición central en la estructura de la clorofila (26). El magnesio de la hoja parece estar asociado con la síntesis de proteínas y con pigmentos de clorofila, y una fracción restante es almacenada en la vacuola (27). La deficiencia de magnesio ha sido definida como uno de los mayores factores que afectan a los cultivos (28) y el cual se va convirtiendo en un problema cada vez mayor con el desarrollo de la industria, la agricultura y la población humana (29).

1.4.6 Encapsulación de *Trichoderma* spp. en una matriz de alginato

Algunas técnicas han sido empleadas para la liberación de agentes de control biológico; así por ejemplo organismos de biocontrol han sido aplicados en líquidos, materia orgánica, como semillas o en arcillas. Las formulaciones deben facilitar el transporte y el almacenamiento de los agentes de biocontrol (30).

La encapsulación en matrices poliméricas es un método de inmovilización alternativo de *Trichoderma* que ha demostrado eficacia para el control biológico en campo en comparación con la suspensión de conidios (31). La encapsulación dentro de una matriz protege al agente de control biológico de factores de estrés externos como contaminaciones, luz UV, temperatura, al proporcionar un microambiente beneficioso, lo que prolonga su vida útil y actividad metabólica durante largos periodos de tiempo (11).

La mayor parte de métodos de encapsulación para los agentes de control biológicos utilizan la gelificación iónica utilizando alginatos (32).

La gelificación iónica se produce cuando una solución de alginato de sodio, gomas o pectinato que contiene el agente de control biológico vivo, se gotea sobre una solución de entrecruzamiento que contiene cationes divalentes como el calcio Ca^{2+} . Se forma como producto una perla o partícula que se solidifica en milisegundos cuando en la superficie de la partícula los cationes reaccionan con las cadenas del biopolímero formando una estructura tridimensional rígida (11)

1.4.7 Actividad antagonica de *Trichoderma* spp. contra *M. roreri*.

El uso de agentes de biocontrol para la mitigación de enfermedades en plantas es actualmente muy deseable, debido a que reduce o elimina la aplicación de pesticidas sintéticos, lo que resulta en un impacto mínimo sobre el medioambiente (33)

Un estudio realizado demostró que algunas cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelos de cultivos del Ecuador mostraron una fuerte actividad antagonica frente a importantes patógenos de plantas tales como *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Mycosphaerella fijiensis* en banano, así como *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en cacao. (9).

Los mecanismos que utilizan las cepas de *Trichoderma* spp. frente a los patógenos implican micoparasitismo, antibiosis, competición, producción de enzimas líticas y producción de metabolitos secundarios (34). Al entrar en contacto con patógenos *Trichoderma* spp., tiende a producir quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas para atacar al patógeno (35) (36)

Se ha observado una gran capacidad inhibitoria de aislados de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma virens* con una antibiosis máxima de 55.5% y antagonismo potencial máximo de 69% sobre el patógeno del cacao *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans (37).

CAPITULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Diseño de Experimento

Para el ensayo a nivel de invernadero se utilizó un diseño factorial 2^k donde $K=3$ con 3 puntos factoriales y 1 punto central.

Los factores o variables independientes definidos fueron: Control absoluto sin *Trichoderma* ni micronutrientes (T1), Control solución de esporas C4B (T2), Control fertilizante comercial (T3), Encapsulado C4B sin micronutrientes (T4), Encapsulado C4B + Magnesio 5000 ppm (T5), Encapsulado C4B + Zinc 800 ppm (T6), Encapsulado C4B + Zinc 400 ppm + Magnesio 2500 ppm (T7), Encapsulado C4B + Zinc 800 ppm + Magnesio 5000 ppm (T8), mientras que las variables de respuesta fueron: clorofila, diámetro de pseudotallo, altura de la planta, número de hojas. En total se efectuaron 8 tratamientos con 12 réplicas cada uno.

Se empleó una comparación de medias mediante Test de Tukey con un nivel de significancia de 5% para las pruebas de laboratorio en lo referente a ritmo de crecimiento

Para las pruebas de inhibición de crecimiento se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de patógenos (PIRGP).

2.2 Cepas de *Trichoderma*

Las cepas de *Trichoderma* empleadas en este estudio se obtuvieron del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL). Se trabajó con *Trichoderma reesei* (C2A) y *Trichoderma ghanense* (C4B). Ambas pertenecen a la colección de cepas de esta institución y fueron identificadas usando los primers que amplifican las secuencias ITS 1 e ITS 5. Se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA) (Difco, Detroit, MI, EE.UU) a 28°C.

2.3 Patógeno

El hongo patógeno *Moniliophthora roreri* (MR088) se obtuvo también de CIBE-ESPOL del banco de cepas de esta institución y se cultivó en agar papa dextrosa (PDA).

2.4 Plantas de banano

Para el análisis de invernadero se utilizó un total de 96 plantas de banano (cv. ‘Williams’ (*Musa* AAA)) que fueron facilitados por el departamento de Fitopatología de CIBE-ESPOL.

2.5 Encapsulamiento

2.5.1 Condiciones iniciales

Se realizó una revisión bibliográfica para determinar las concentraciones de partida para el desarrollo de formulaciones. Las concentraciones empleadas en las formulaciones se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones ensayadas para los diferentes co-encapsulados de *Trichoderma*, zinc y magnesio

Composición	Concentración
<i>T. reesei</i>	1x10 ⁷ conidias
<i>T. ghanense</i>	1x10 ⁷ conidias
Magnesio	2500 ppm-5000 ppm-10000 ppm- 15000 ppm-30000 ppm
Zinc	400 ppm-800 ppm-5000 ppm-10000 ppm-25000 ppm

2.5.2 Co-encapsulados

En una solución de acetato de calcio (Loba Chemie Pvt. Ltd, Mumbai, India) al 2% se disolvieron el magnesio y el zinc a diferentes concentraciones. Se empleó óxido de magnesio (Mallinckrodt, U.K.) como fuente de magnesio y acetato de zinc (BDH Chemicals, U.K.) como fuente de zinc. Se empleó una solución de alginato de sodio (Loba Chemie Pvt. Ltd, Mumbai, India) al 1.5%. Las soluciones fueron esterilizadas en autoclave por 20 minutos a 121°C.

Se preparó una solución de *T. reesei* y *T. ghanense* por el método de dilución y se realizó el conteo de conidios en la cámara de Neubauer. Se preparó una mezcla de *Trichoderma* con alginato de sodio en concentración de 1x10⁷ esporas. Con una micropipeta, se tomó una alícuota de 30µL de la mezcla y se dejó gotear sobre la mezcla de acetato – micronutriente. Los encapsulados formados se usaron para los ensayos consiguientes.

El efecto de la incorporación de Mg y Zn a diferentes concentraciones en las formulaciones de co-encapsulados de *Trichoderma spp.* se verificó mediante pruebas de crecimiento en medio PDA, las formulaciones para cada cepa se verifican en la tabla 2 y tabla 3. Los co-encapsulados con distintas formulaciones fueron sembrados a un centímetro del borde de la placa Petri y se tomó la medida del crecimiento radial cada 24 horas hasta las 72 horas y poder así determinar las concentraciones óptimas. Se tomó como control positivo encapsulados sin magnesio y zinc

Tabla 2. Formulaciones de *T. reesei* para evaluación de crecimiento en medio PDA

Tratamiento	Descripción
Control 1	Solución de esporas <i>T. reesei</i> ;
Control 2	Control absoluto encapsulado sin micronutrientes
T1	<i>T. reesei</i> + Zn 400 ppm
T2	<i>T. reesei</i> + Zn 800 ppm
T3	<i>T. reesei</i> + Zn 5000 ppm
T4	<i>T. reesei</i> + Zn 25000ppm
T5	<i>T. reesei</i> + Mg 2500 ppm
T6	<i>T. reesei</i> + Mg 5000 ppm
T7	<i>T. reesei</i> + Mg 10000 ppm
T8	<i>T. reesei</i> + Mg 15000 ppm
T9	<i>T. reesei</i> + Mg 30000 ppm.

Tabla 3. Formulaciones de *T. ghanense* para evaluación de crecimiento en medio PDA

Tratamiento	Descripción
Control 1	Disco PDA <i>T. ghanense</i>
Control 2	Control absoluto encapsulado sin micronutrientes
T1	<i>T. ghanense</i> + Zn 400 ppm
T2	<i>T. ghanense</i> + Zn 800 ppm
T3	<i>T. ghanense</i> + Zn 5000 ppm
T4	<i>T. ghanense</i> + Zn 10000ppm
T5	<i>T. ghanense</i> + Zn 25000ppm
T6	<i>T. ghanense</i> + Mg 2500 ppm

T7	<i>T. ghanense</i> + Mg 5000 ppm
T8	<i>T. ghanense</i> + Mg 10000 ppm
T9	<i>T. ghanense</i> + Mg 15000 ppm
T10	<i>T. ghanense</i> + Mg 30000 ppm

2.6 Actividad *in vitro* para control de *M. royeri*.

Se seleccionaron 4 concentraciones de magnesio y zinc y dos controles de acuerdo al crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en medio PDA como se muestra en la tabla 4 para un análisis de su potencial inhibitorio del crecimiento y capacidad micoparasítica contra *M. royeri*, utilizando el método de cultivo dual. Los ensayos de inhibición-antagonismo de crecimiento del patógeno se realizaron por triplicado en PDA colocando un disco de 5 mm de diámetro del hongo patógeno a 1 centímetro del borde de una placa Petri. En el extremo opuesto de cada placa se inoculó el co-encapsulado preparado de *Trichoderma* y micronutrientes. Las muestras fueron incubadas a 30°C durante 10 días y se registró el diámetro del crecimiento radial cada 24 horas, para verificar el ritmo de crecimiento del antagonista y del patógeno. Luego se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de patógenos (PIRGP) a las 72 horas de crecimiento de los co-encapsulados de *Trichoderma* y se calculó mediante la fórmula de Ezziyyani et al. (38).

$$\text{PIRGP} = \frac{(R1-R2)}{R1} \times 100$$

Donde R1 es el radio del patógeno control sin enfrentamiento contra *Trichoderma* spp. y R2 es el radio del patógeno enfrentado a *Trichoderma* spp.

Para la evaluación de micoparasitismo de las cepas de *T. reesei* y de *T. ghanense* contra *M. royeri* por medio del método de cultivo dual, verificadas a los 10 días de crecimiento se empleó la escala descrita en estudios anteriores por Ezziyyani et al. (38) en donde expresa: 0) no existe invasión de *Trichoderma* en la superficie del hongo patógeno; 1) 25% de invasión en la superficie del hongo patógeno; 2) 50% de invasión en la superficie del hongo patógeno; 3) 100% de invasión en la superficie del hongo patógeno; 4) 100% de invasión en la superficie del hongo patógeno y esporulación sobre este. El ensayo de cultivo dual para cada formulación se realizó por duplicado.

Tabla 4. Formulaciones de co-encapsulados ensayadas para análisis de inhibición de crecimiento y capacidad micoparasítica contra *M. roreri*.

Tratamiento	Descripción
Control:	Control de <i>T. reesei</i> y <i>T. ghanense</i> encapsulado sin micronutrientes
T1:	<i>T. reesei</i> / <i>T. ghanense</i> +Zn 800 ppm
T2:	<i>T. reesei</i> / <i>T. ghanense</i> +Zn 5000 ppm
T3:	<i>T. reesei</i> / <i>T. ghanense</i> + Mg 5000 ppm
T4:	<i>T. reesei</i> / <i>T. ghanense</i> +Mg 15000 ppm
T5:	<i>T. reesei</i> / <i>T. ghanense</i> + Zn 800 ppm-Mg 5000 ppm
T6:	<i>T. reesei</i> / <i>T. ghanense</i> +Zn 5000 ppm-Mg 15000 ppm.

2.6.1 Actividad quitinolítica de los encapsulados de *Trichoderma* spp.

La quitina está presente en la pared celular de la mayoría de los hongos patógenos y, *Trichoderma* spp. por su actividad micoparasítica libera enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces de la quitina. En este ensayo verificamos la capacidad de esta cepa para producir estas enzimas.

2.6.1.1 Medio de cultivo indicador de la actividad quitinolítica.

Para la evaluación de la actividad quitinolítica de la cepa de *T. ghanense* co-encapsulada en conjunto con los minerales magnesio y zinc se procedió a preparar un medio basal solido con los siguientes reactivos y en las siguientes concentraciones: 2g de KH_2PO_4 , 15g de agar base, 0.3g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.0g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g ácido cítrico monohidratado, 200 μL de Tween-20, 4.5g de quitina y como indicador de viraje añadimos 0.15g de purpura de bromocresol, llevándolo a un volumen final de 1000 mL; el pH fue ajustado a 4.7 para posteriormente esterilizar esta solución en autoclave a 121°C por 15 minutos. Se dispense el medio preparado en cajas Petri desechables, una vez que se solidifica el medio, en el centro de la placa se coloca una perla de co-encapsulados de *Trichoderma* con magnesio

y zinc en sus distintos tratamientos. Se incubaron las cajas a 28°C durante 4 días hasta cuando se aprecie la formación de una zona de color distinto (39).

2.7 Inoculación de plantas de banano (cv. ‘Williams’ (*Musa AAA*)) fase 1 de crecimiento con co-encapsulados de *T. ghanense*. en invernadero.

El ensayo se realizó en el invernadero de CIBE-ESPOL

Para el mismo se utilizaron 96 plantas de banano (cv. ‘Williams’ (*Musa AAA*)) que se encontraban en fase 1 (fase infantil). Se realizó una adaptación previa de las plantas durante una semana, en sustrato de cultivo a base de turba. Pasado el tiempo de adaptación se traspararon las plantas a un recipiente individual que contenía una base de sustrato consistente en tierra, turba y arena.

Se probaron 3 controles que fueron: control absoluto sin *Trichoderma* ni micronutrientes, control solución de esporas *T. ghanense* y control fertilizante comercial (composición del fertilizante en Anexo 5). Los tratamientos ensayados fueron: encapsulado C4B sin micronutrientes; encapsulado C4B + Magnesio 5000 ppm; encapsulado C4B + Zinc 800 ppm; encapsulado C4B + zinc 400 ppm + magnesio 2500 ppm; encapsulado C4B + zinc 800 ppm + magnesio 5000 ppm. Para cada control y tratamiento se emplearon 12 plantas de banano. Se procedió a fabricar los co-encapsulados tal como fue descrito anteriormente. Para la inoculación tomamos una cantidad equivalente a 1 g de los co-encapsulados preparados y con mucho cuidado los colocamos en la parte de la raíz de la planta de banano; en el caso del tratamiento fertilizante comercial, colocamos la misma cantidad, la única excepción es en el caso del tratamiento solución de esporas por encontrarse en estado líquido, motivo por el cual con la ayuda de una micropipeta colocamos un volumen de 5 mL por cada planta. Controlamos los parámetros del cubículo de invernadero para lo cual fijamos la temperatura del cubículo en 28 °C y regamos las plantas periódicamente (Anexo 3).

Las lecturas de los parámetros que se analizaron en las plantas de banano se tomaron cada 8 días por un periodo de 9 semanas y los parámetros analizados fueron: clorofila, diámetro de pseudotallo, altura de la planta y número de hojas.

Para el análisis estadístico utilizamos el programa Infostat versión 2020. Realizamos un ANOVA del ensayo general considerando los resultados semana a semana. El análisis de varianza está considerando las medidas repetidas, es decir la evolución de todo el ensayo en el tiempo. Utilizamos el test LSD Fisher, realizamos una comparación por tratamiento con un nivel de significación de 0,05. Guardamos los residuos del análisis para su posterior análisis multivariado. Para el MANOVA, analizamos los resultados de la última semana (semana 9) de todas las variables a la vez. Empleamos para el mismo el método de comparación Hotelling, con un nivel de significación de 0.05.

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo específico 1

3.1 Formulación idónea de encapsulados de *Trichoderma* con Zn y Mg

Los co-encapsulados fueron preparados a las concentraciones especificadas tal como es descrito en la metodología. Se verificó la presencia de las esporas de *Trichoderma* spp. dentro de las co-encapsulados por medio de microscopio electrónico (Anexo 1) y por medio de estereoscopio (Anexo 2); se sembraron las formulaciones en medio PDA, observándose una diferencia en el crecimiento de las formulaciones de encapsulados. Se pudo verificar que a medida que aumenta la concentración del mineral aplicado sea este magnesio o zinc, se retrasa el crecimiento de las cepas de *T. reesei* y *T. ghanense*. Para *T. reesei* la menor concentración demostró un crecimiento casi similar a la del control de encapsulado sin micronutrientes, aunque menor que solución de esporas; mientras que la mayor concentración de micronutrientes inhibió totalmente el crecimiento de *T. reesei* en el caso del zinc o parcialmente como en el caso del magnesio. (Gráfico 1 y Figura 3).

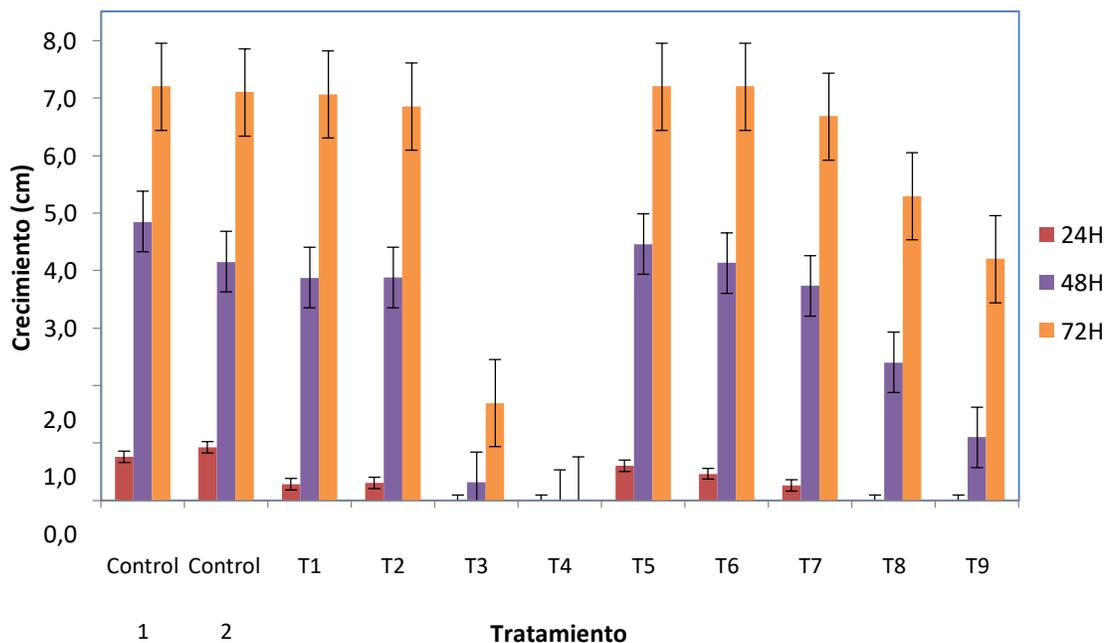


Gráfico 1. Crecimiento de las diferentes formulaciones de *T. reesei* con magnesio y/o zinc. **Control 1:** Solución de esporas *T. reesei*; **Control 2:** encapsulado sin micronutrientes; **T1:** *T. reesei* + Zn 400 ppm; **T2:** *T. reesei* + Zn 800 ppm; **T3:** *T. reesei* + Zn 5000 ppm; **T4:** *T. reesei* + Zn 25000ppm; **T5:** *T. reesei* + Mg 2500 ppm; **T6:** *T. reesei* + Mg 5000 ppm; **T7:** *T. reesei* + Mg 10000 ppm; **T8:** *T. reesei* + Mg 15000 ppm; **T9:** *T. reesei* + Mg 30000 ppm.

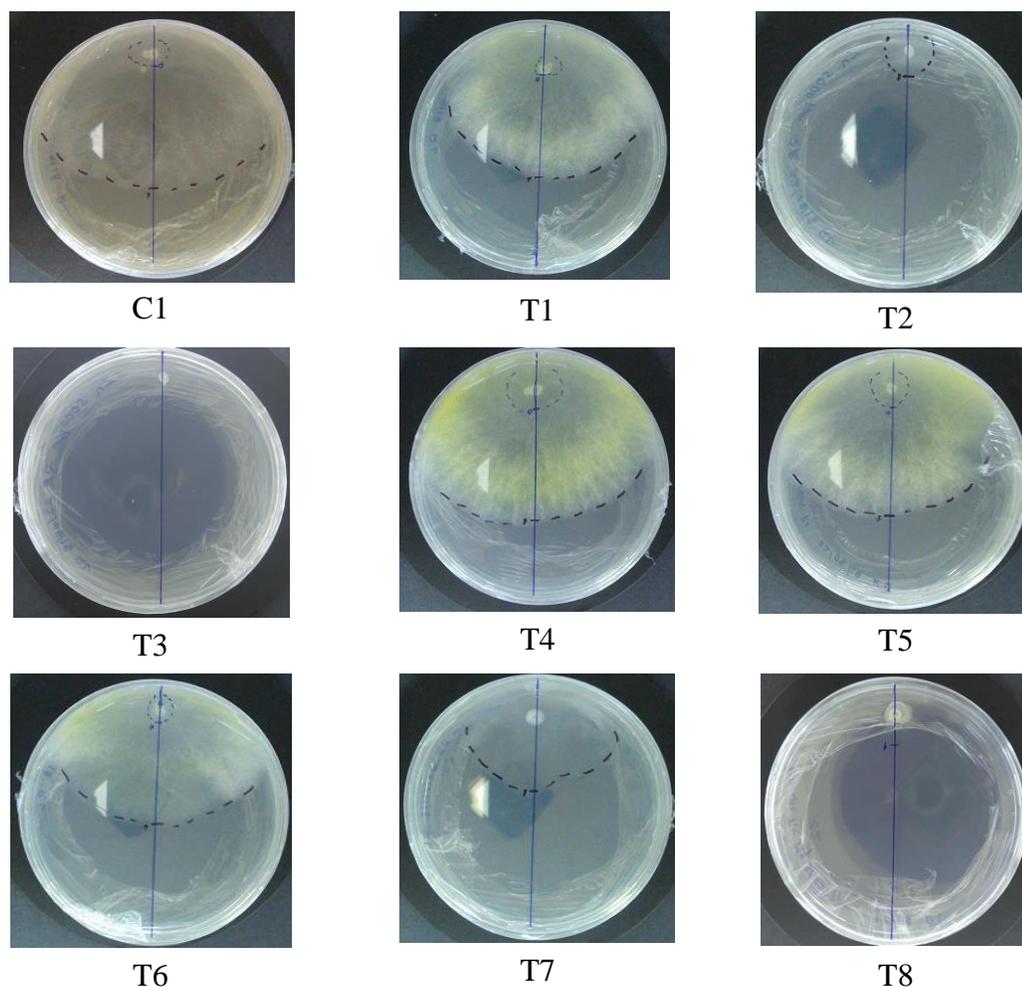


Figura 3. Crecimiento de *T. reesei* co-encapsulada con magnesio y zinc a diferentes concentraciones. Crecimiento a las 48 horas. **C1:** encapsulado sin micronutrientes; **T1:** *T. reesei* + Zn 800 ppm; **T2:** *T. reesei* + Zn 5000 ppm; **T3:** *T. reesei* + Zn 25000ppm; **T4:** *T. reesei* + Mg 2500 ppm; **T5:** *T. reesei* + Mg 5000 ppm; **T6:** *T. reesei* + Mg 10000 ppm; **T7:** *T. reesei* + Mg 15000 ppm; **T8:** *T. reesei* + Mg 30000 ppm.

En el caso de la cepa de *T. ghanense* se evidenció un crecimiento más lento en comparación con la cepa de *T. reesei*. (Gráfico 2). En lo referente al efecto de los micronutrientes se evidenció que de manera similar a lo observado en *T. reesei*, a medida que aumenta la concentración del micronutriente disminuye el crecimiento del hongo, así en el caso del zinc a menores concentraciones muestra un crecimiento

semejante al del encapsulado sin micronutriente, pero menor que el disco de PDA de *T. ghanense*, mientras que las concentraciones mayores de micronutrientes retrasan el crecimiento significativamente. En el caso del magnesio existe menor diferencia en el crecimiento a medida que aumenta la concentración como se muestra en la Figura 4.

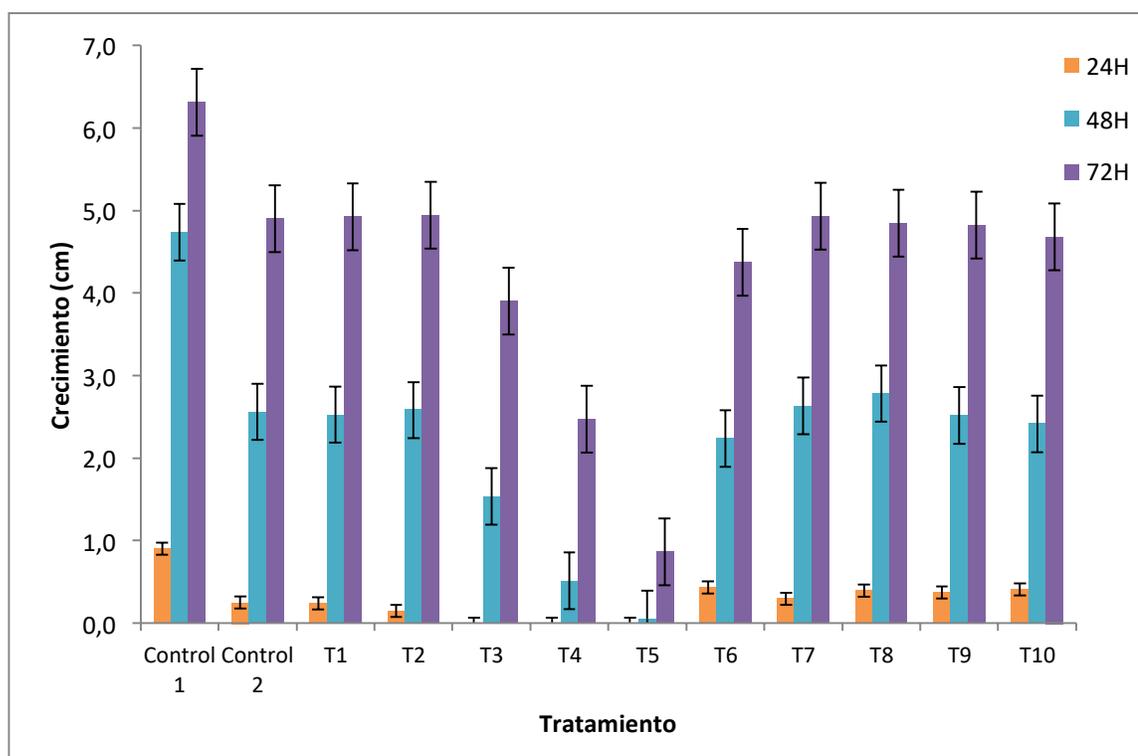


Gráfico 2. Crecimiento de las diferentes formulaciones de *T. ghanense* con magnesio y/o zinc. Formulaciones: Control 1: Disco PDA *T. ghanense* ; Control 2: Encapsulado sin micronutrientes; **T1**: *T. ghanense* + Zn 400 ppm; **T2**: *T. ghanense* + Zn 800 ppm; **T3**: *T. ghanense* + Zn 5000 ppm; **T4**: *T. ghanense* + Zn 10000 ppm **T5**: *T. ghanense* + Zn 25000 ppm; **T6**: *T. ghanense* + Mg 2500 ppm; **T7**: *T. ghanense* + Mg 5000 ppm; **T8**: *T. ghanense* + Mg 10000 ppm; **T9**: *T. ghanense* + Mg 15000 ppm; **T10**: *T. ghanense* + Mg 30000 ppm.

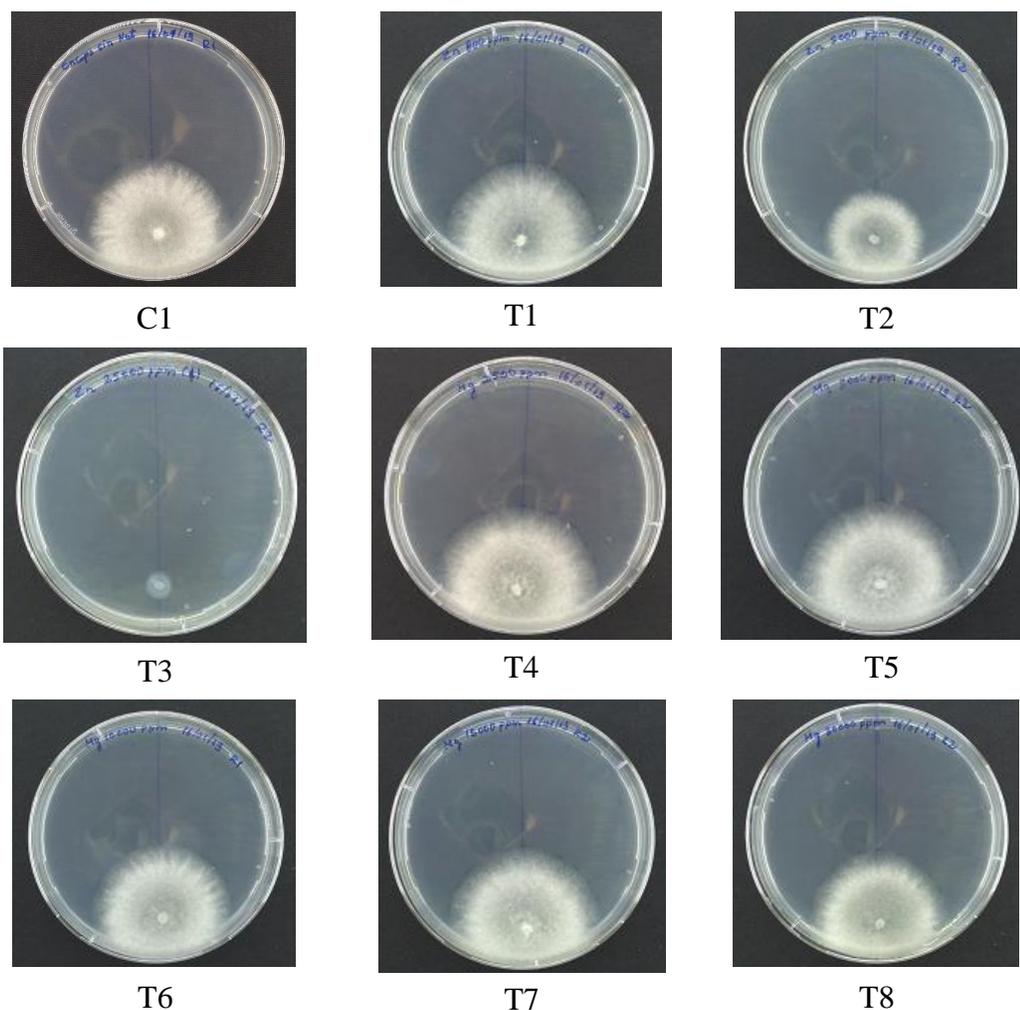


Figura 4. Crecimiento de *T. ghanense* co-encapsulada con magnesio y zinc a diferentes concentraciones. Crecimiento a las 48 horas; **C1:** Encapsulado sin micronutrientes; **T1:** *T. ghanense* + Zn 800 ppm; **T2:** *T. ghanense* + Zn 5000 ppm; **T3:** *T. ghanense* + Zn 25000ppm; **T4:** *T. ghanense* + Mg 2500 ppm; **T5:** *T. ghanense* + Mg 5000 ppm; **T6:** *T. ghanense* + Mg 10000 ppm; **T7:** *T. ghanense* + Mg 15000 ppm; **T8:** *T. ghanense* + Mg 30000 ppm.

Mediante uso del programa estadístico InfoStat se determinó la diferencia entre tratamientos al obtener un valor $P < 0.05$. Para verificar los tratamientos más efectivos en el caso de ambas cepas de *Trichoderma* se empleó el Test de Tukey y se compararon las medias para determinar las concentraciones idóneas. Los tratamientos más efectivos en el caso de *T. reesei* correspondían a: *T. reesei*-Mg 2500ppm (4,1); *T. reesei* - Mg 5000ppm (3,9); *T. reesei* - Zn 400ppm (3,7); *T. reesei* - Zn 800ppm (3,7). Mientras que

en el caso de *T. ghanense* los tratamientos más efectivos correspondieron a: *T. ghanense* - Zn 800ppm (2,6); *T. ghanense* - Mg 5000ppm (2,6); *T. ghanense* - Zn 400ppm (2,6).

Los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, nos permitieron seleccionar en el caso de ambas cepas los mejores tratamientos según el crecimiento que tuvo el hongo en el medio PDA, en concordancia con lo manifestado por Wells et al (40) quien indico que la cepa de *Trichoderma harzianum* se desarrollaba rápidamente cubriendo el medio de cultivo, contenido en placas Petri de 100 mm en 4 días. Además, se tiene en consideración que la encapsulación simultánea de agentes biológicos y químicos en el mismo compartimento no debe disminuir sus actividades, sino lo contrario, beneficiarla, como en el caso del encapsulamiento de *T. viride* con cationes de cobre que promueve el crecimiento de la cepa (12), a semejanza de este estudio en donde se encapsula al agente de biocontrol con minerales como son el magnesio y el zinc.

Objetivo específico 2.

3.2 Actividad *in vitro* de los co-encapsulados de *Trichoderma* con magnesio y zinc para el control de *M. roreri*.

Se pudo verificar la inhibición de crecimiento del patógeno en los cultivos duales para ambas cepas a partir de los 3 días luego que se inoculara el encapsulado. De manera general se observó que todos los tratamientos presentan un porcentaje de inhibición alto (>70%) lo cual demuestra la efectividad de *Trichoderma* como agente de control biológico frente a *M. roreri*. Además, como apreciamos en el grafico 3, no existe una diferencia mayor de los porcentajes entre tratamientos. En el caso de *T. reesei*, se pudo observar que los micelios de esta cepa entran en contacto con la colonia de *M. roreri*. (Figura 5) y de los tratamientos el que presenta un mayor PIRGP corresponde a la formulación que no contiene micronutrientes (88,7%) seguido de la formulación de *T. reesei*-Zinc 800ppm. (87,9%). (Gráfico 3).

En el caso de la cepa de *T. ghanense* también se evidenció contacto de los micelios con la colonia de *M. roreri*. (Figura 5). Los tratamientos el que presenta un mayor PIRGP corresponde a las formulaciones de *T. ghanense* -Mg 15000ppm (87,4%) y *T. ghanense* -Zinc 5000ppm + Mg 15000ppm (87,9%). (Gráfico 3).

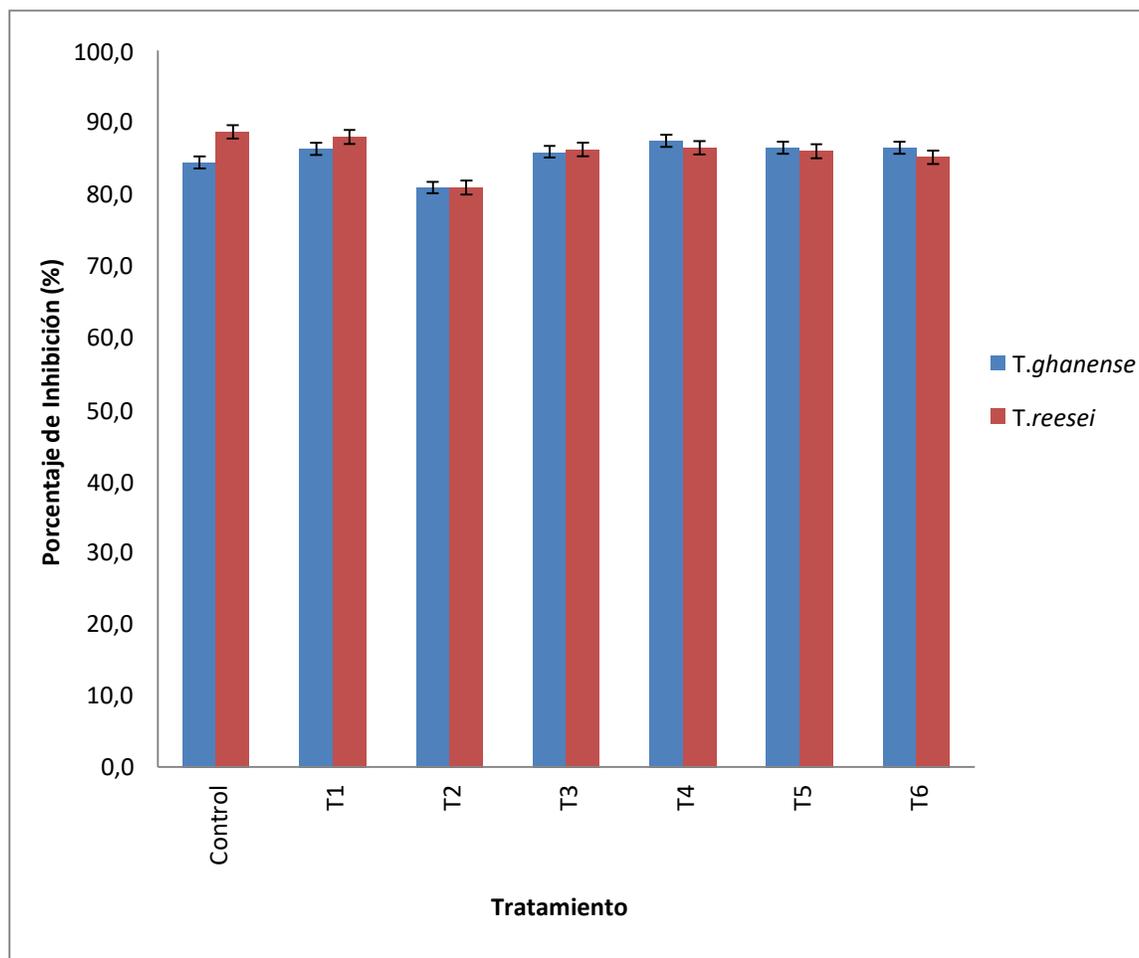


Gráfico 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de patógenos para las distintas formulaciones frente a *M. royeri*. Resultados a las 72 horas de crecimiento de los encapsulados de *Trichoderma*. **Control:** Control de *T. reesei/T. ghanense* sin micronutrientes; **T1:** *T. reesei/T. ghanense* +Zn 800 ppm; **T2:** *T. reesei/T. ghanense* +Zn 5000 ppm; **T3:** *T. reesei/T. ghanense* + Mg 5000 ppm; **T4:** *T. reesei/T. ghanense* +Mg 15000 ppm; **T5:** *T. reesei/T. ghanense* + Zn 800 ppm-Mg 5000 ppm; **T6:** *T. reesei/T. ghanense* +Zn 5000 ppm-Mg 15000 ppm.

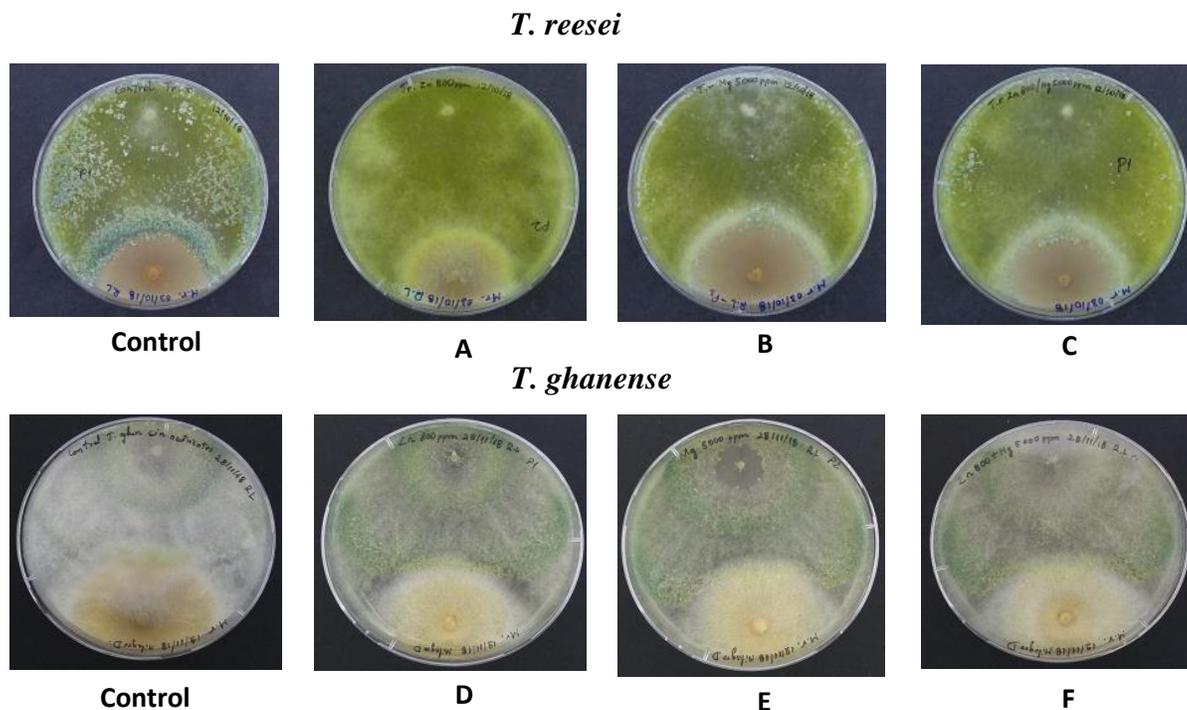


Figura 5. Inhibición radial de formulaciones de co-encapsulados de *T. reesei* / *T. ghanense*, magnesio y zinc frente a *M. roreri*. Resultados a los 3 días de crecimiento del co-encapsulado de *Trichoderma*. Control de *T. reesei* y *T. ghanense* sin micronutrientes; **A:** *T. reesei* + Zn 800 ppm; **B:** *T. reesei* + Mg 5000 ppm; **C:** *T. reesei* + Zn 800 ppm-Mg 5000 ppm; **D:** *T. ghanense* + Zn 800 ppm; **E:** *T. ghanense* + Mg 5000 ppm; **F:** *T. ghanense* + Zn 800 ppm-Mg 5000 ppm.

En el ensayo de micoparasitismo, se pudo evidenciar que las cepas de *T. reesei* tuvieron una actividad baja (grados 1-3), lo que indica una cobertura del 25 al 100% de las colonias del patógeno, pero sin esporular sobre el patógeno (Figura 6), lo que confirma lo manifestado por estudios anteriores que demostraron que *T. reesei* tiene una actividad antagónica débil en comparación a otras especies (9). Mientras que la cepa de *T. ghanense* mostró un fuerte micoparasitismo contra *M. roreri* (grados 3-4) con una cobertura del 75- 100% con esporulación sobre el patógeno (Figura 6).

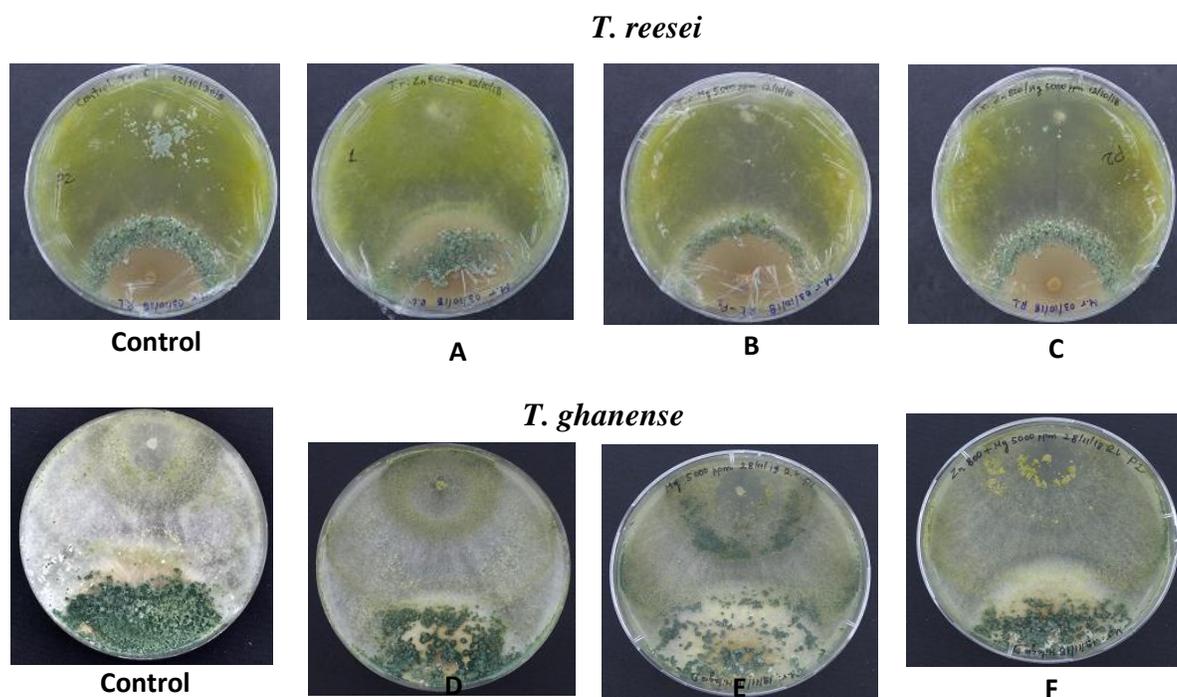


Figura 6. Micoparasitismo de formulaciones de co-encapsulados de *T. reesei* y *T. ghanense* frente a *M. royeri*. Resultados a los 10 días de inoculación del co-encapsulado. Control de *T. reesei* y *T. ghanense* sin micronutrientes; **A:** *T. reesei*+Zn 800 ppm; **B:** *T. reesei*+Mg 5000 ppm; **C:** *T. reesei*+ Zn 800 ppm-Mg 5000 ppm; **D:** *T. ghanense* +Zn 800ppm; **E:** *T. ghanense* +Mg 5000ppm; **F:** *T. ghanense* +Zn 800ppm-Mg 5000 ppm.

Estudios anteriores han demostrado que *T. ghanense* funciona como un agente de control biológico para una amplia gama de patógenos de plantas aéreas y terrestres de importancia económica cuya actividad de micoparasitismo corresponde a una combinación de competición de nutrientes, producción de enzimas y antibiosis (41). En el caso de la cepa de *T. reesei* la formulación que presenta una mayor actividad es *T. reesei* - Zinc 800 ppm (grado 3), mientras que en el caso de la cepa de *T. ghanense*, la formulación con mayor actividad corresponde a la formulación que no contiene micronutrientes y a la formulación de *T. ghanense* - Zinc 5000 ppm. (grado 4) (Gráfico 4). Los resultados obtenidos demuestran no todas las cepas de *Trichoderma* spp. son eficaces para el mismo propósito o en la misma medida tal como ha sido manifestado en otros estudios (42).

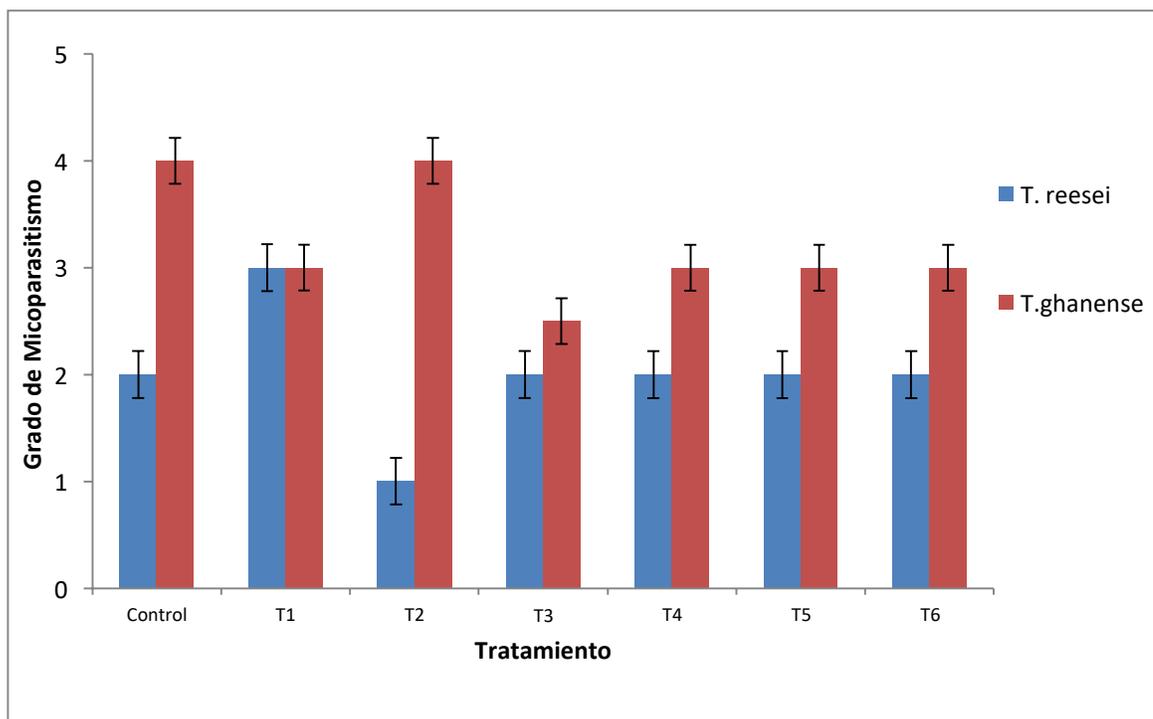


Gráfico 4. Índice de micoparasitismo para las distintas formulaciones de co-encapsulados de *T. reesei* y *T. ghanense* con magnesio y zinc frente a *M. roreri*. **Control:** Control de *T. reesei* y *T. ghanense* sin micronutrientes; **T1:** *T. reesei*/*T. ghanense* +Zn 800 ppm; **T2:** *T. reesei*/*T. ghanense* +Zn 5000 ppm; **T3:** *T. reesei*/*T. ghanense* + Mg 5000 ppm; **T4:** *T. reesei*/*T. ghanense* +Mg 15000ppm; **T5:** *T. reesei*/*T. ghanense* + Zn 800ppm-Mg 5000ppm; **T6:** *T. reesei*/*T. ghanense* +Zn 5000ppm-Mg 15000 ppm.

3.2.1 Actividad quitinolítica de los co-encapsulados de *Trichoderma ghanense*.

El ensayo para determinar la actividad quitinolítica de la cepa de *Trichoderma ghanense* en medio sólido se realizó en un medio enriquecido con quitina coloidal al que se adicionó purpura de bromocresol como indicador de la producción de quitinasas al cambiar de color.

La quitina es un polímero insoluble de β -(1-4)- N-acetil-D-glucosamina y un componente principal de las paredes celulares de los hongos (43). Las cepas de *Trichoderma* spp. libera enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces β -(1-4) de la quitina que forma parte de la pared celular de los patógenos liberando su contenido citoplasmático (44). Las cepas de *Trichoderma* con actividad quitinolítica usan la

quitina coloidal como una fuente de carbono descomponiéndola en N-Acetil glucosamina aumentando el pH del medio lo que provoca el cambio de coloración del indicador de amarillo a púrpura en la zona alrededor del crecimiento de *Trichoderma* spp. (39). Este cambio de coloración se dio en todas las formulaciones de co-encapsulados y controles de la cepa de *T. ghanense* (Figura 7) indicando una actividad quitinolítica positiva y demostrándose que la adición de los minerales zinc y magnesio no afectan la actividad inhibitoria de la cepa.

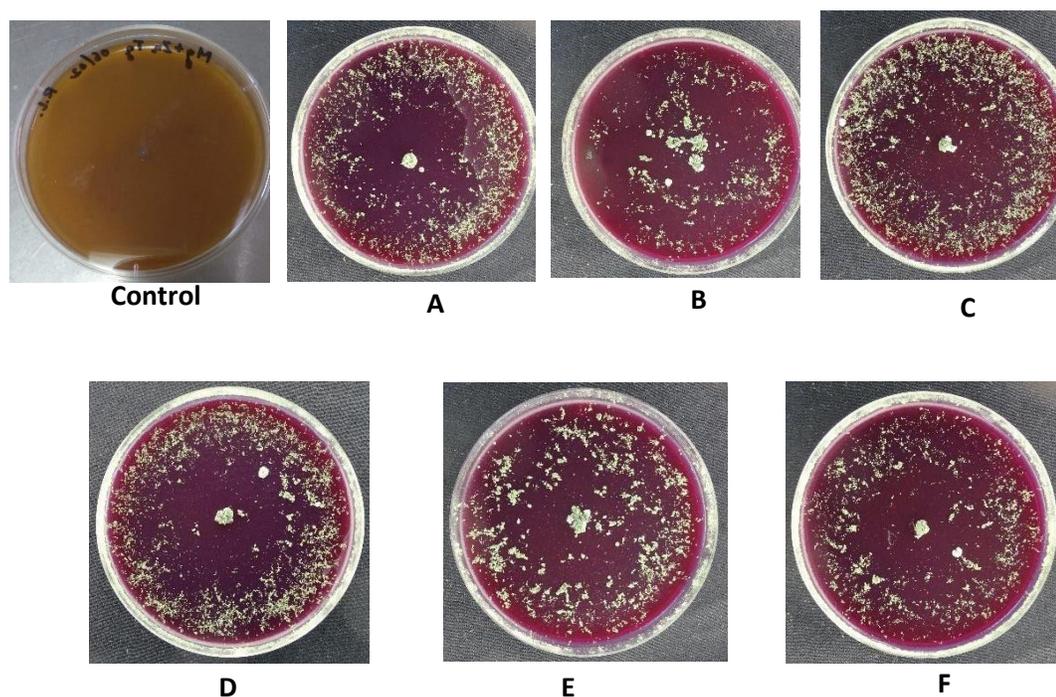


Figura 7. Actividad quitinolítica de las distintas formulaciones de *T. ghanense* co-encapsulados con magnesio y zinc. Resultados a las 96 horas. **A:** *T. ghanense* encapsulado sin micronutrientes, **B:** solución de esporas *T. ghanense*, **C:** *T. ghanense* + Zn 800 ppm, **D:** *T. ghanense* + Mg 5000 ppm, **E:** *T. ghanense* + Zn 400 + Mg 2500 ppm, **F:** *T. ghanense* + Zn 800 ppm + Mg 5000 ppm.

Objetivo Especifico 3

3.3 Efecto *in vivo* sobre plantas de banano (cv. ‘Williams’ (*Musa* AAA)) de las formulaciones de zinc y magnesio co-encapsulados con *Trichoderma* spp.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores seleccionamos los mejores tratamientos y se procedió a verificar el efecto *in vivo* de los co-encapsulados elaborados en sus distintas formulaciones sobre la plantas de banano, determinandose los resultados desde la semana 1 hasta la semana 9 de ensayo, en donde comprobamos lo siguiente.

3.3.1 Efecto individual sobre los parámetros de crecimiento de la planta de banano de la semana 1 a la semana 9.

En la tabla 5 se observa que en lo referente al parámetro clorofila el tratamiento que demostró un mejor desempeño a lo largo del ensayo fue fertilizante comercial con un valor superior al resto. Los otros tratamientos que demostraron un buen desempeño fueron encapsulados sin micronutrientes y encapsulado C4B + Zn 400 y Mg 2500 ppm. El tratamiento con el resultado más bajo fue el control absoluto. Se puede asumir por ende un efecto promotor de clorofila por parte de *Trichoderma* tal como lo manifestado en estudios anteriores en donde se reportó que algunos compuestos orgánicos volátiles producidos por *Trichoderma* aumentaban la eficiencia de fotosíntesis y contenido de clorofila en *A. thaliana* (45). Sin embargo, en otros estudios no se ha evidenciado mejora en el parámetro de clorofila con aplicación de *Trichoderma* (46). Esto podría deberse a la cepa empleada en este estudio, ya que según Harman (47) la respuesta depende de las especies del género *Trichoderma*, las cepas escogidas y el tipo de cultivo.

Tabla 5. Resultados del análisis ANOVA de la semana 1 a la semana 9 para el parámetro de clorofila

Tratamiento	Media	n	E.E				
Control absoluto	19,13	108	0,78	A			
C4B + Magnesio 5000 ppm	21,97	108	0,78		B		
C4B + Zinc 800 ppm	24,00	108	0,78		B	C	
C4B + Zn800 + Mg5000 ppm	24,68	108	0,78			C	
Solución de esporas C4B	24,85	108	0,78			C	
C4B + Zn400 + Mg2500 ppm	24,87	108	0,78			C	

C4B sin micronutrientes	24,97	108	0,78			C	
Control fertilizante comercial	38,65	108	0,78				D

Valor P < 0,05

Según lo observado en las tablas 6 y 7, el tratamiento que mejor respuesta demostró para los parámetros diámetro de pseudotallo y altura fue nuevamente fertilizante comercial, seguido del tratamiento encapsulado C4B + Zn 800 ppm, mientras que el tratamiento que demostró la menor respuesta en ambos parámetros fue C4B + Zn 800 + Mg 5000 ppm. Esto demuestra que la combinación de magnesio y zinc no promueve la mejora de los parámetros antes mencionados, sin embargo, observamos que el zinc aplicado de forma individual produce un mejor resultado en comparación con el control absoluto. Esto coincide con estudios realizados en donde la aplicación de zinc promovió una mejor germinación, así como elongación de raíz y tallo (48). Este efecto podría estar vinculado con la actividad del zinc como precursor de la síntesis de auxinas que influyen sobre la división celular, así como por el papel que desempeñan en la reactividad del ácido indolacético el cual funciona como fitoestimulante hormonal (49). Mientras que para magnesio se han verificado ensayos donde no se logró mayor rendimiento en un cultivo de maíz con la adición de este mineral en comparación con una fertilización testigo (50), lo cual también se pudo apreciar en este ensayo realizado donde no manifestó mejora alguna en el crecimiento de la planta.

Tabla 6. Resultados del análisis ANOVA de la semana 1 a la semana 9 para el parámetro de diámetro de pseudotallo

Tratamiento	Media (cm)	n	E.E						
C4B + Zn800 + Mg5000 ppm	3,41	108	0,03	A					
Control absoluto	3,47	108	0,03	A	B				
Solución de esporas C4B	3,51	108	0,03		B	C			
C4B + Zn400 + Mg2500 ppm	3,58	108	0,03			C	D		
C4B + Magnesio 5000 ppm	3,65	108	0,03				D	E	

C4B sin micronutrientes	3,68	108	0,03					E	
C4B + Zinc 800 ppm	3,70	108	0,03					E	
Control fertilizante comercial	4,01	108	0,03						F

Valor P < 0,05

Tabla 7. Resultados de análisis ANOVA de la semana 1 a la semana 9 para el parámetro altura

Tratamiento	Media (cm)	n	E.E			
C4B + Zn800 + Mg5000 ppm	8,89	108	0,13	A		
Solución de esporas C4B	8,93	108	0,13	A		
Control absoluto	9,06	108	0,13	A		
C4B sin micronutrientes	9,08	108	0,13	A		
C4B + Magnesio 5000 ppm	9,71	108	0,13		B	
C4B + Zn400 + Mg2500 ppm	9,74	108	0,13		B	
C4B + Zinc 800 ppm	10,06	108	0,13		B	
Control fertilizante comercial	11,77	108	0,13			C

Valor P < 0,05

En la tabla 8 observamos que en el parámetro número de hojas, el tratamiento que mejor desempeño tuvo fue nuevamente fertilizante comercial, seguido del tratamiento solución de esporas, mientras que el tratamiento que demostró la menor respuesta en este caso fue C4B + Zn 800 + Mg 5000 ppm juntamente con C4B encapsulado sin micronutrientes. Nuevamente comprobamos que la combinación de los dos minerales zinc y magnesio no favorecen el desarrollo del número de hojas, mientras que los tratamientos sin encapsular y C4B encapsulado sin micronutrientes tienen un buen desempeño lo que demuestra la actividad promotora de *Trichoderma* en plantas como fue manifestado anteriormente.

Tabla 8. Resultado de análisis ANOVA de la semana 1 a la semana 9 para el parámetro número de hojas.

Tratamiento	Media (núm. hojas)	n	E.E				
C4B + Zn800 + Mg5000 ppm	6,87	108	0,09	A			
C4B + Magnesio 5000 ppm	6,88	108	0,09	A			
C4B + Zinc 800 ppm	6,96	108	0,09	A			
Control absoluto	7,09	108	0,09	A	B		
C4B + Zn400 + Mg2500 ppm	7,26	108	0,09		B	C	
C4B sin micronutrientes	7,48	108	0,09			C	
Solución de esporas C4B	7,48	108	0,09			C	
Control fertilizante comercial	7,96	108	0,09				D

Valor P < 0,05

En los resultados anteriores podemos apreciar que, si existen diferencias significativas entre tratamientos, para cada una de las variables de estudio (clorofila, diámetro de pseudotallo, altura, número de hojas). En el Gráfico 5 apreciamos a manera general que el tratamiento fertilizante comercial tiene el mejor desempeño durante el tiempo de ensayo, seguidamente del tratamiento *T. ghanense* + Zn 800 ppm mientras que el tratamiento de *T. ghanense* + Mg 5000 ppm + Zn 800 ppm tiene el desempeño más bajo, seguido del control absoluto sin encapsulados. Los resultados obtenidos para todos los parámetros evidencian de manera general la actividad promotora del crecimiento de *Trichoderma* lo cual concuerda con estudios anteriores que se ha demostrado que este hongo promueve el crecimiento en numerosas plantas cultivadas (7)(51)(52), además de mejorar parámetros agronómicos de la planta como son altura, diámetro de pseudotallo y área foliar (53).

Una vez realizado el análisis ANOVA y obtenidos los residuos, procedemos a verificar la normalidad de los mismos empleando la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks donde consideramos un valor p de >0.01 en donde cada variable analizada cumple con la normalidad: Clorofila 0.2863, Diámetro de pseudotallo 0.4067, Altura 0.3168, Número de hojas 0.0222. Asumimos por lo tanto la

normalidad de las variables con el fin de tener una visión general de los tratamientos. (Anexo 4)

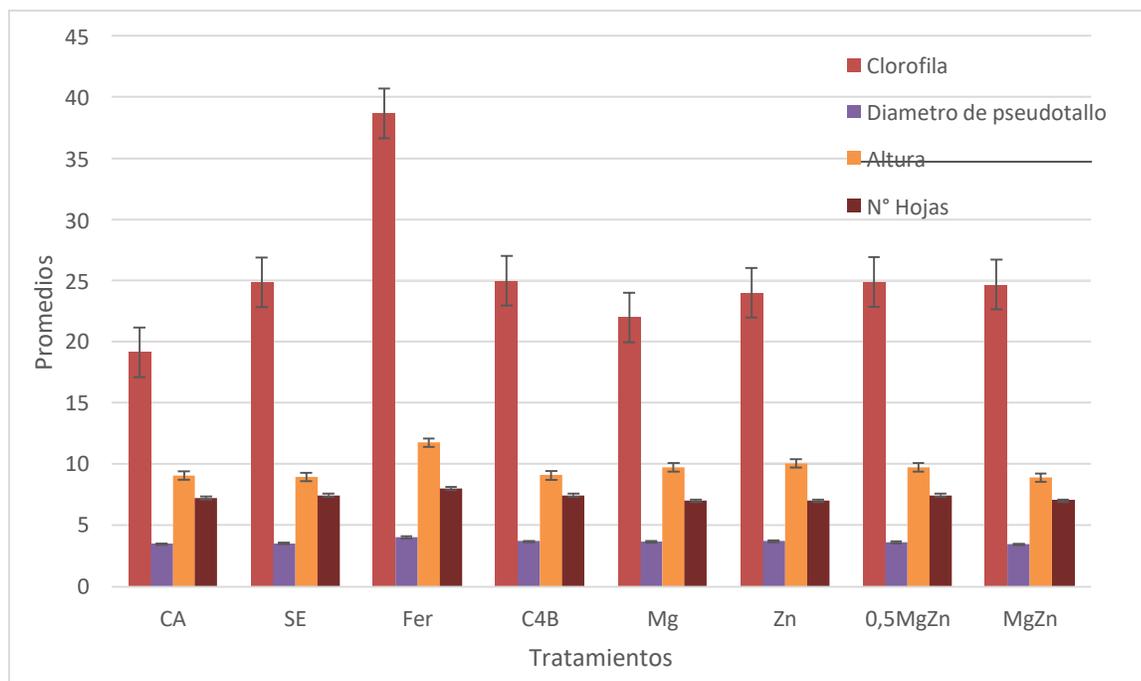


Gráfico 5. Evolución de los parámetros evaluados de la semana 1 hasta la semana 9 de ensayo. **CA:** control Absoluto, **SE:** Solución de esporas, **Fer:** Fertilizante comercial, **C4B:** Encapsulado *T. ghanense* sin micronutrientes, **Mg:** *T. ghanense* + Magnesio 5000 ppm, **Zn:** *T. ghanense* + Zn 800 ppm, **0,5MgZn:** *T. ghanense* +Zn 400 ppm+Mg 2500 ppm, **MgZn:** *T. ghanense* + Mg 5000 ppm + Zn 800 ppm.

3.3.2 Efecto combinado sobre los parámetros de crecimiento de la planta de banano durante la semana 9.

En la Tabla 9, se puede verificar que el análisis del efecto combinado sobre todos los parámetros estudiados de la planta de banano a la semana 9 del ensayo, el tratamiento fertilizante comercial presenta los mejores valores diferenciándose de todos los demás. Seguidamente los tratamientos con mejor respuesta fueron *T. ghanense* + Zn 800 ppm y solución de esporas, aunque en menor medida. Mientras que los tratamientos *T. ghanense* + Zn 800 ppm + Mg 5000 ppm y Control Absoluto presentan los valores más bajos entre los tratamientos (Gráfico 6).

Tabla 9. Resultados de análisis MANOVA de la semana 9 para todos los parámetros.

Prueba Hotelling Alfa=0,05									
Tratamiento	Media clorofila	Media diámetro de pseudotallo (cm)	Media altura (cm)	Media N° Hojas (num. Hojas)	n				
Control fertilizante comercial	24,59	4,22	14,33	7,42	12	A			
C4B + Zn400 + Mg2500 ppm	17,01	3,57	11,08	7	12		B		D
C4B + Zn800 + Mg5000 ppm	18,83	3,42	9,79	6,83	12		B		E
C4B + Zinc 800 ppm	16,81	3,76	11,37	7	12			C	D
Control absoluto	14,93	3,65	9,98	7,17	12			C	E
C4B + magnesio 5000 ppm	15,17	3,66	11,13	6,5	12				D
C4B sin micronutrientes	19,14	3,64	9,82	7,17	12				E
Solución de esporas C4B	20,99	3,53	9,78	7,17	12				E

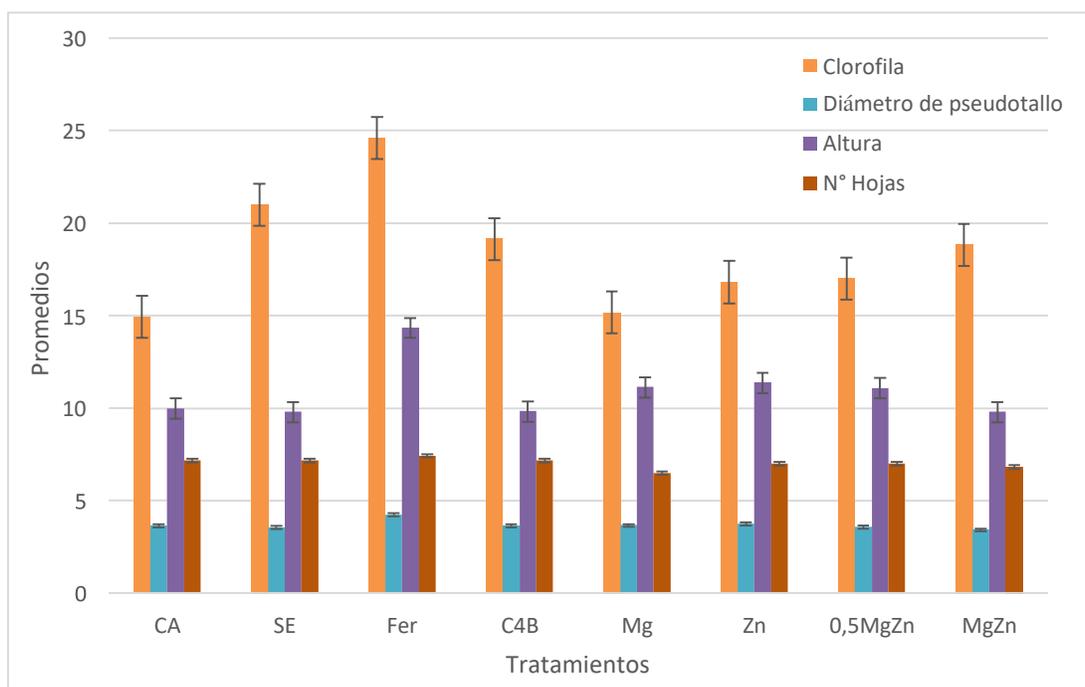


Gráfico 6. Parámetros de la planta de banano evaluados en la semana 9. **CA:** control absoluto, **SE:** Solución de esporas, **Fer:** Fertilizante comercial, **C4B:** Encapsulado *T. ghanense* sin micronutrientes, **Mg:** *T. ghanense* + Magnesio 5000 ppm, **Zn:** *T. ghanense* + Zn 800 ppm, **0,5MgZn:** *T. ghanense* +Zn 400 ppm+Mg 2500 ppm, **MgZn:** *T. ghanense* + Mg 5000 ppm + Zn 800 ppm.

Varios estudios han demostrado que este efecto benéfico de *Trichoderma* en el crecimiento de las plantas tiene relación con el nivel de colonización y con la extensión del micelio externo, el cual es necesario para la absorción de fósforo (54)(55). *Trichoderma* spp. despliegan una gran cantidad de proteínas secretadas tanto enzimáticas como de otro tipo, que cumplen un papel principal en las interacciones de estos hongos benéficos para las raíces de las plantas (56), lo que promovería la mejora en el desarrollo de las plantas. Estudios realizados mostraron que *Trichoderma harzianum* aumenta la solubilidad de fosfato y micronutrientes como iones zinc, cobre, hierro y manganeso que tienen una baja solubilidad y desempeñan un papel importante en el crecimiento de la planta (57)(58). Otro de los factores posibles para la mejora en el crecimiento de las plántulas podría ser la capacidad de *Trichoderma* de promover el desarrollo del crecimiento de las raíces. Se reportó un aumento de aproximadamente el doble de raíces profundas inoculadas con *Trichoderma harzianum* en el maíz en contraste con el control no inoculado (59).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las condiciones iniciales idóneas de encapsulación tanto para *T. reesei* y *T. ghanense* fueron las de menor concentración de zinc (800 ppm) y magnesio (5000 ppm), las cuales permitieron el normal desarrollo y crecimiento del agente biocontrolador en medio PDA. Se podría considerar probar nuevas cepas de *Trichoderma* spp. que podrían tener un mejor crecimiento

La inhibición de crecimiento de ambas cepas fue alta >70%, sin embargo, la formulación de la cepa de *T. reesei* en los tratamientos control sin micronutrientes (88,7%) y la formulación de *T. ghanense*-Zinc 5000 ppm + Mg 15000 ppm. (87,9%) mostraron un mejor efecto contra *M. royeri* en las pruebas *in vitro* realizadas. El mismo efecto se observa en las pruebas de micoparasitismo en donde *T. ghanense* tenía un nivel 4 de micoparasitismo en comparación de *T. reesei* que alcanzaba un nivel 3 de micoparasitismo. Podemos por lo tanto considerar formulaciones de *T. ghanense* como las más efectivas para el desarrollo de biofungicidas y biofertilizantes.

Las pruebas de invernadero en plantas de banano inoculadas con encapsulados y controles, demostraron un efecto superior del tratamiento con fertilizante comercial, seguido por los encapsulados de *Trichoderma* + Zn 800 ppm y *Trichoderma* encapsulado sin magnesio y zinc.

Como recomendación se podría elaborar una formulación que además de la cepa de *Trichoderma* co-encapsule componentes del fertilizante comercial tales como fosforo, potasio y nitrogeno lo que podría mejoraría el efecto promotor del crecimiento de los encapsulados. Así mismo se puede probar con varias cepas distintas de *Trichoderma* y evaluar la que tenga mejor efecto.

BIBLIOGRAFIA

1. Shukla, R., & Shukla, A. (2012). Market potential for biopesticides: a green product for agricultural applications. *International Journal of Management Research and Review*, 2(1), 91–99.
2. Kumar, S., & Singh, A. (2015). Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides*, 06(02).
3. Odukkathil, G., & Vasudevan, N. (2013). Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(4), 421–444.
4. Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55.
5. Hermosa, R., Belén Rubio, M., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16(2), 69–80.
6. Gomes, E. V., Costa, M. D. N., De Paula, R. G., Ricci De Azevedo, R., Da Silva, F. L., Noronha, E. F., José Ulhoa, C., Neves Monteiro, V., Elena Cardoza, R., Gutiérrez, S., & Nascimento Silva, R. (2015). The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. *Scientific Reports*, 5(17998), 1–13.
7. Li, R. X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q. R., Li, R., & Chen, W. (2015). Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma Harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PLoS ONE*, 10(6), 1–16.
8. Al-Ani, L. K. T. (2018). *Trichoderma*: Beneficial Role in Sustainable Agriculture by Plant Disease Management. 105–126.
9. Galarza, L., Akagi, Y., Takao, K., Kim, C. S., Maekawa, N., Itai, A., Peralta, E., Santos, E., & Kodama, M. (2015). Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 81(3), 201–210.
10. Cumagun, C. J. R. (2014). Advances in Formulation of *Trichoderma* for Biocontrol. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 3, 527–531.
11. Vemmer, M., & Patel, A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3), 380–389.
12. Vinceković, M., Jalšenjak, N., Topolovec-Pintarić, S., Dermić, E., Bujan, M., & Jurić, S. (2016). Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection: Chitosan/Alginate Microcapsules Loaded with Copper Cations and *Trichoderma viride*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(43), 8073–8083.
13. Massoud, O. N., & Kamel, S. M. (2015). The inhibitory effects of free and encapsulated arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma viride* against charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Egyptian*

- Journal of Biological Pest Control*, 25(2), 489–497.
14. Bissett, J., Szakacs, G., Nolan, C. A., Druzhinina, I., Gradinger, C., & Kubicek, C. P. (2003). New species of *Trichoderma* from Asia. *Canadian Journal of Botany*, 81(6), 570–586.
 15. Harman, G. E., Kubicek, CP (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* Volume 1 Basic biology, taxonomy and genetics, Taylor and Francis Ltd., London, UK, 300pp
 16. Harman, G. E., Kubicek, CP (1998). *Trichoderma* And *Gliocladium* , Volume 2 : Enzymes , Biological Control and commercial applications, Taylor and Francis Ltd., London, UK.
 17. Rajesh, R. W., Rahul, M. S., & Ambalal, N. S. (2016). *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research*, 11(22), 1952–1965.
 18. Bailey, B. A., Melnick, R. L., Strem, M. D., Crozier, J., Shao, J., Sicher, R., Phillips-Mora, W., Ali, S. S., Zhang, D., & Meinhardt, L. (2014). Differential gene expression by *Moniliophthora roreri* while overcoming cacao tolerance in the field. *Molecular Plant Pathology*, 15(7), 711–729.
 19. Pico Jimmy, Calderón Darío, Fernández Fabián, D. A. (2012). INIAP – Guía del Manejo Integrado de Enfermedades del Cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Amazonía.
 20. Bailey, B. A., Evans, H. C., Phillips-mora, W., Ali, S. S., & Meinhardt, L. W. (2017). *Moniliophthora roreri* , causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular Plant Pathology*, 9(7), 1580–1594.
 21. Phillips-Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56(6), 911–922.
 22. Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Mishra, S., Chauhan, D. K., & Dubey, N. K. (2015). Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(7), 1–14.
 23. Krämer, U., & Clemens, S. (2005). Functions and homeostasis of zinc , copper , and nickel in plants. *Topics in Current Genetics*, 14, 214–254.
 24. Kawagashira, N., Ohtomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Kikuchi, S., & Higo, K. (2001). Multiple Zinc Finger Motifs and with Insect Comparison of Plant. *Genome Informatics*, 369, 368–369.
 25. Senbayram, M., Gransee, A., Wahle, V., & Thiel, H. (2015). Role of magnesium fertilisers in agriculture : plant – soil continuum. *Crop and Pasture Science*, 66, 1219–1229.
 26. Cowan, J. A. (2002). Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *BioMetals*, 15(3), 225–235.
 27. Karley, A. J., & White, P. J. (2009). Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 291–298.
 28. Farhat, N., Elkhouni, A., Zorrig, W., Smaoui, A., Abdelly, C., & Rabhi, M. (2016).

- Effects of magnesium deficiency on photosynthesis and carbohydrate partitioning. In *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(6), 145.
29. Guo, W., Nazim, H., Liang, Z., & Yang, D. (2016). Magnesium deficiency in plants: An urgent problem. *Crop Journal*, 4(2), 83–91.
 30. Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumsden, R.D., Connick Jr, W. J. (1985). Encapsulation of Potential Biocontrol Agents in an Alginate-Clay Matrix. *Phytopathology*, 75(7), 774–777.
 31. Oancea, F., Raut, I., Şesan, T. E., & Cornea, P. C. (2016). Dry Flowable Formulation of Biostimulants *Trichoderma* Strains. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 10, 494–502.
 32. Connick, W. J. (1988). Formulation of Living Biological Control Agents with Alginate. *Pesticide Formulations, ACS Symposium Series. American Chemical Society*, 518, 241–250.
 33. 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.
 34. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10.
 35. Castro, R., Álvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., & Garcia, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular characterization of a extracellular chitinase produced by *Serratia* sp . BIOMI-363 706 Using colloidal chitin as substrate. *Rev. Soc Química Del Perú*, 77(2), 101–108.
 36. González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., & Miranda, I. (2011). *Caracterización bioquímica de aislamientos de*. 26(1), 23–29
 37. Reyes-Figueroa, O., Ortiz-García, C. F., La Cruz, M. T. De, Lagunes-Espinoza, L. D. C., & Valdovinos-Ponce, G. (2016). Especies de *Trichoderma* del agroecosistema cacao con potencial de biocontrol sobre *Moniliophthora roreri*. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 22(2), 149–163.
 38. Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M., & Candela Castillo, M. (2004). “*Trichoderma harzianum*” como biofungicida para el biocontrol de “*Phytophthora capsici*” en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35–45.
 39. Agrawal, T., & Kotasthane, A. S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in central India. *SpringerPlus*, 1(1), 1–10.
 40. Wells, H., Bell, D., & Jaworski, C. (1972). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a Biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*, 62, 442–447.
 41. Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S. L., Lorito, M., Kubicek, C. P., & Mach, R. L. (2005). Improvement of the Fungal Biocontrol Agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3959–3965.

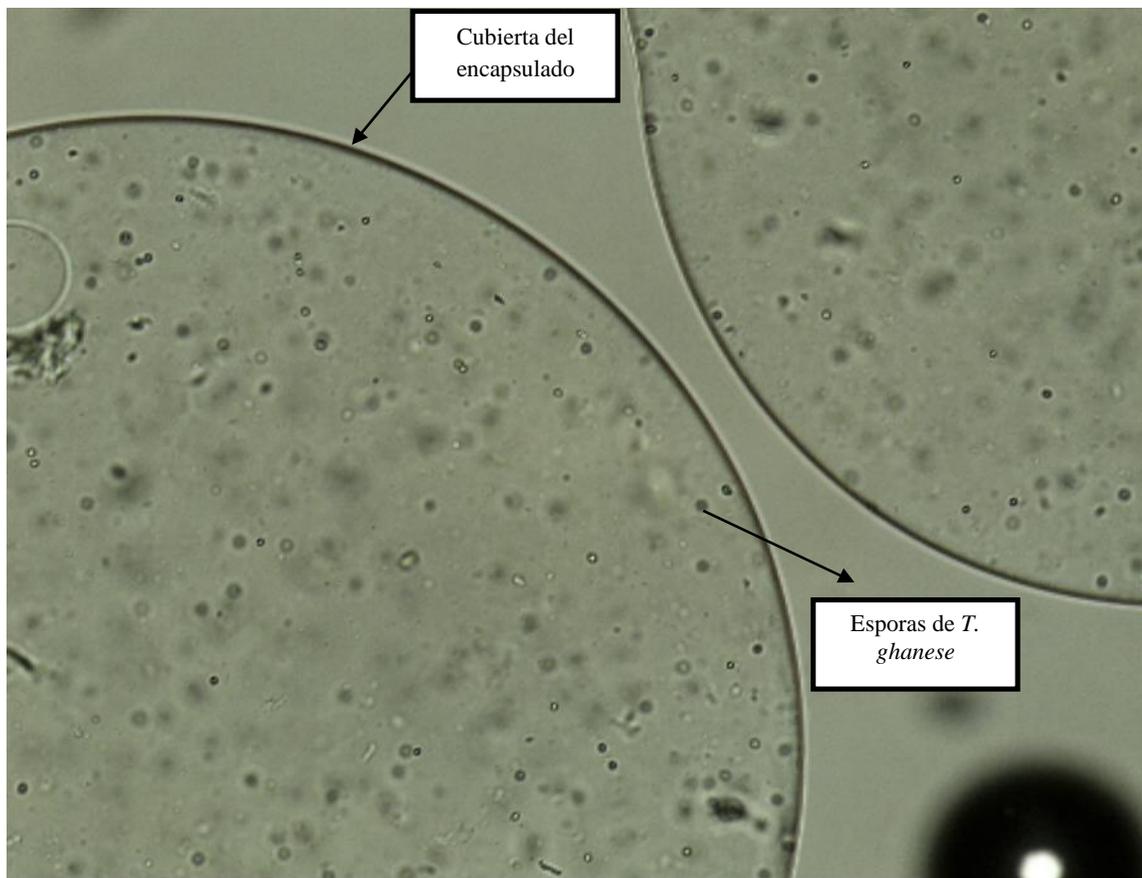
42. Gajera, H. P., Savaliya, D. D., Patel, S. V., & Golakiya, B. A. (2015). Lipoxygenase-related defense response induced by *Trichoderma viride* against *Aspergillus niger* Van Tieghem, inciting collar rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Phytoparasitica*, *43*(2), 229–240.
43. Shinya, T., Nakagawa, T., Kaku, H., & Shibuya, N. (2015). Chitin-mediated plant-fungal interactions: Catching, hiding and handshaking. *Current Opinion in Plant Biology*, *26*, 64–71.
44. Barnett, H. L. (1963). The Nature of Mycoparasitism by Fungi. *Annual Review of Microbiology*, *2*, 1–14.
45. Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Vi Nguyen, D., Rostás, M., Braithwaite, M., De Souza, J. T., Jimenez-Bremont, J. F., Ohkura, M., Stewart, A., & Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. Affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*, *8*(2), 1–18.
46. Díaz, G., Rodríguez, G., Montana, L., Miranda, T., & Basso, C. (2020). Efecto de la aplicación de bioestimulantes y *Trichoderma* sobre el crecimiento en plantulas de maracuya (*Passiflora edulis* Sims) en vivero. *Bioagro*, *32*(3), 195–204.
47. Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, *96*(2), 190–194.
48. Prasad, T. N. V. K. V., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Raja Reddy, K., Sreepasad, T. S., Sajanlal, P. R., & Pradeep, T. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*, *35*(6), 905–927.
49. Rehman, H. ur, Aziz, T., Farooq, M., Wakeel, A., & Rengel, Z. (2012). Zinc nutrition in rice production systems: A review. *Plant and Soil*, *361*(1–2), 203–226.
50. Sancho, M., & Rivas, A. (2018). Incorporación del silicato de magnesio en la fertilización mineral del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en La Vega, San Carlos, Costa Rica. *AgroInnovacion En El Tropico Húmedo*, *1*(1), 25–34.
51. Singh, B. N., Dwivedi, P., Sarma, B. K., Singh, G. S., & Singh, H. B. (2018). *Trichoderma asperellum* T42 reprograms tobacco for enhanced nitrogen utilization efficiency and plant growth when fed with N nutrients. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 163.
52. Toghueo, R. M. K., Eke, P., Zabalgoceazcoa, Í., de Aldana, B. R. V., Nana, L. W., & Boyom, F. F. (2016). Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*, *96*, 8–20.
53. Flores, R. (2019). Control biológico de la marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) raza 1, utilizando té de compost, *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis*, en plantas de banano del cultivar ‘Gros Michel’ (*Musa AAA*) bajo condiciones de invernadero en Guápiles (tesis de pregrado). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
54. Amijee, F., Tinker, P. B., & Stribley, D. P. (1989). The development of

- endomycorrhizal root systems. *New Phytologist*, *111*(3), 435–446.
55. Abbott, L. K., & Robson, A. D. (1981). Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: Effect of inoculum type. *Australian Journal of Agricultural Research*, *32*(4), 631–639.
 56. Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A., & Mukherjee, P. K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, *32*(2), 62–85.
 57. Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T., & Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth- promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(7), 2926–2933.
 58. Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, *235*(2), 235–242.
 59. Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Biological Control*, *84*, 377–393.

ANEXOS

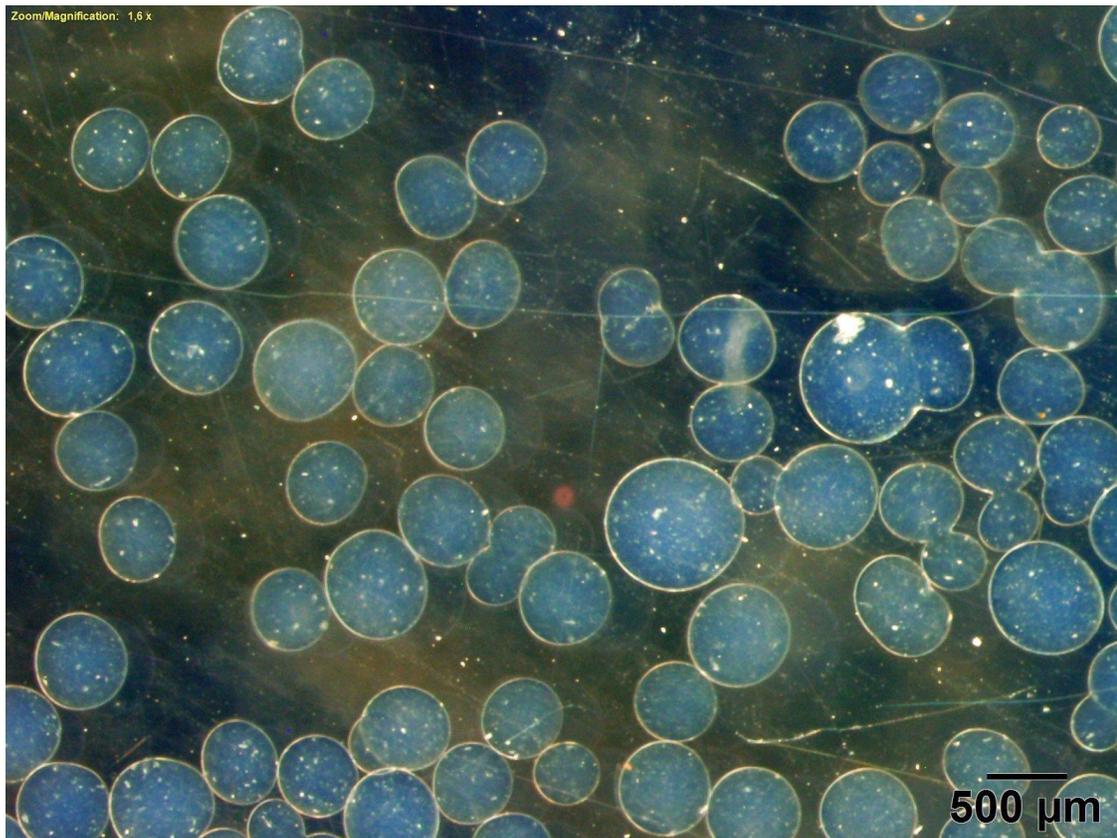
ANEXO 1

Observación de encapsulados de *T. ghanense* al microscopio electrónico, objetivo 100X



ANEXO 2

Observación de encapsulados al estereoscopio



ANEXO 3

Esquema del proceso de inoculación de plantas de banano (cv. 'Williams' (*Musa AAA*)) con co-encapsulados de *Trichoderma* y controles: A: Preparación de los co-encapsulados; B: Co-encapsulados preparados; C: Inoculación de formulaciones y controles; D: Plántula con encapsulados; E: Cuidados de la planta; F: plántulas en crecimiento.



A



B



C



D



E



F

ANEXO 4

**Análisis de la Normalidad Shapiro-Wilks de los residuos de los parámetros en
estudio en la semana 9**

Semana	Variable	n	Media	D.E.	W	p (Unilateral D)*
9	RDUO Clorofila	96	0	5,95	0,97	0,2863
9	RDUO Diametro de pseudotallo	96	0	0,33	0,98	0,4067
9	RDUO Altura	96	0	1,33	0,97	0,3168
9	RDUO N° Hojas	96	0	0,9	0,96	0,0222

***P>0,05 cumplen con la normalidad.**

ANEXO 5

Composición del fertilizante comercial

COMPUESTO	FÓRMULA	PORCENTAJE
Nitrógeno Total	N	15,0%
Nitrógeno amoniacal	NH ₄ ⁺	8.3%
Nitrógeno nítrico	NO ₃ ⁻	6.7%
Fosforo asimilable	P ₂ O ₅	4,0%
Potasio soluble en agua	K ₂ O	23,0%
Magnesio	MgO	4,0%
Azufre total	S	2.0%
Boro	B	0,1%
Zinc	Zn	0,1%
Humedad máxima		1%

FUENTE: Ficha de seguridad fertilizante ABOTEK®.