

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Encapsulación de *Trichoderma asperellum* en partículas biopoliméricas con quitosanos de diferentes pesos moleculares para el control biológico de *Moniliophthora roreri*.

Proyecto de investigación

Ludwing Alexander Carrera Navarrete

**José Alvarez Barreto, Ph.D.
Antonio León, Ph.D.**

Trabajo de titulación de pregrado presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniero Químico

Quito, 15 de diciembre de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE PEGRADO

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Encapsulación de *Trichoderma asperellum* en partículas biopoliméricas con quitosanos de diferentes pesos moleculares para el control biológico de *Moniliophthora roreri*.

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

José Alvarez Barreto, Ph.D.

Firma del profesor

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 15 de diciembre de 2017

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombre: Ludwing Alexander Carrera Navarrete

Código de estudiante: 00109134

C. I.: 0503294753

Lugar, Fecha Quito, 15 de diciembre de 2017

DEDICATORIA

El presente trabajo va a dedicado a mis abuelos, quienes en vida llenaron de valores a mi familia. Ambos fueron los pilares que me brindaron la oportunidad de prepararme espiritualmente y profesionalmente para la culminación de este proyecto y de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis padres quienes con trabajo diario lograron darme la mejor educación. Son mi tesoro. Agradezco a mi tutor José Álvarez por brindarme la oportunidad de trabajar juntos y crear conocimientos en el campo de la ingeniería. Agradezco a mi co-tutor Antonio León por brindarme las herramientas necesarias para realizar el trabajo de investigación con la colaboración de Darío Ramírez, Karen Herrera, y compañeros de laboratorio.

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó las actividades antagonistas y micoparasitarias *in vitro*, de *Trichoderma asperellum* encapsulado en partículas biopoliméricas de alginato de sodio con quitosanos de diferentes pesos moleculares, como una nueva alternativa para el control biológico del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* que causa la enfermedad Monialisis en las plantas de cacao en el Ecuador. Se extrajo quitosano de exoesqueleto de camarón de origen ecuatoriano y se caracterizó mediante viscosimetría capilar para calcular el peso molecular junto con otros quitosanos comerciales, y mediante espectrometría infrarroja por transformada de Fourier, FTIR, para estimar el grado de desacetilación del quitosano. Se escogieron 3 quitosanos de pesos moleculares bajo, medio y alto para la encapsulación a 3 distintas concentraciones y con $1 * 10^6$ conidios/mL de *T. asperellum* encapsulados en partículas de 30 uL de volumen. Se comprobó la encapsulación de quitosano en la partícula mediante espectroscopia infrarroja. Se evaluó la actividad antagónica de *T. asperellum* encapsulada en las partículas biopoliméricas durante 10 días, mediante la técnica de cultivos duales dando al hongo fitopatógeno *M. roreri* 13 días de crecimiento previo al inicio de los cultivos debido a las diferentes tasas de crecimiento de los hongos. Para la evaluación de micoparasitismo se dejó crecer a *M. roreri* por sobretoda la superficie de la caja Petri y se sembraron las partículas sobre el micelio del hongo. En los ensayos de antagonismo se encontró que para los 3 pesos moleculares de quitosano y a las 3 concentraciones utilizadas, *T. asperellum* fue capaz de inhibir el crecimiento de *M. roreri* con porcentajes de entre 30 a 40%, muy aproximados al porcentaje de inhibición de crecimiento PIC% de 38.62% dado por el control de *T. asperellum* sin encapsular, comprobando así que la encapsulación con quitosano no produce efectos negativos sobre el crecimiento del hongo antagonista. En los ensayos de micoparasitismo, *T. asperellum* no creció en ningún caso. Por lo cual, se reporta que *T. asperellum* mostró actividades antagónicas a través de la partícula

biopolimérica para todos los quitosanos de bajo, medio y alto peso molecular a las concentraciones de 0.10, 0.25, y 0.50% p/v y únicamente en los ensayos de cultivos duales cuando *M. royeri* no ocupaba toda la superficie de la caja Petri, en comparación a las condiciones de micoparasitismo donde no se mostraron actividad alguna. Se realizaron análisis Anova y pruebas de post hoc Tukey al 5% para el tiempo de incubación, concentración de quitosano, peso molecular de quitosano, y PIC%. Se encontró que solamente el tiempo tiene significancia estadística en el crecimiento de *T. asperellum*, y en cambio, para el crecimiento de *M. royeri* tiene significancia estadística el tiempo, concentración de quitosano y peso molecular de quitosano. En conclusión, *T. asperellum* co-encapsulada con quitosano en la partícula biopolimérica presenta actividades antagónicas frente a *M. royeri* con un PIC de alrededor de 40% para la mayoría de ensayos con las diferentes concentraciones y pesos moleculares de quitosano. El quitosano no inhibió el crecimiento de *T. asperellum*. En cambio, la inhibición sobre el fitopatógeno fue comparable con *T. asperellum* sin encapsular lo cual es una ventaja para evaluar las aplicaciones de este nuevo control biológico en campo en plantaciones de cacao del Ecuador. Sin embargo, la cepa no presentó actividad micoparasitaria cuando el fitopatógeno estaba en desarrollo avanzado en las placas Petri.

Palabras clave: control biológico, cacao, *T. asperellum*, *M. royeri*, quitosano, partícula, encapsulación, antagonismo, micoparasitismo, PIC%.

ABSTRACT

In the present work, the antagonistic and mycoparasitic activities *in vitro* of *Trichoderma asperellum* encapsulated in biopolymeric particles of sodium alginate with chitosans of different molecular weights were evaluated as a new alternative for the biological control of the phytopathogenic fungus *Moniliophthora roreri* responsible for the disease Monialisis in the cocoa plants in Ecuador. Chitosan was extracted from shrimp exoskeleton of Ecuadorian origin and characterized by capillary viscosimetry to calculate the average molecular weight together with other commercial chitosans, and by infrared spectrometry by Fourier transform, FTIR, to estimate the degree of deacetylation of chitosan. Three chitosans of low, medium and high molecular weights were chosen for the encapsulation at 3 different concentrations and with 1×10^6 conidios/mL of *T. asperellum* encapsulated in particles of 30 uL of volume. The encapsulation of chitosan in the particle was checked by infrared spectroscopy. The antagonistic activity of *T. asperellum* encapsulated in the biopolymer particles was evaluated for 10 days by the technique of dual cultures giving the phytopathogenic fungus *M. roreri* 13 days of growth prior to the start of the cultures due to the different growth rates of the fungi. For the evaluation of mycoparasitism *M. roreri* was allowed to grow above all the surface of the Petri dish and the particles were seeded on the mycelium of the fungus. In the antagonism tests it was found that for the 3 molecular weights of chitosan and the 3 concentrations used, *T. asperellum* was able to inhibit the growth of *M. roreri* with percentages between 30 to 40%, very close to the percentage of growth inhibition PIC% of 38.62% given by the control of *T. asperellum* without encapsulating, thus verifying that the encapsulation with chitosan does not produce negative effects on the growth of the antagonist fungus. In trials of mycoparasitism, *T. asperellum* did not grow in any case. Therefore, it is reported that *T. asperellum* showed antagonistic activities through the biopolymeric particle for all the chitosans of low, medium and high molecular weight

at the concentrations of 0.10, 0.25, and 0.50% w/v and only in the tests of dual cultures when *M.roreri* did not occupy the entire surface of the Petri dish, compared to mycoparasitism conditions where no activity was shown. Anova analyzes and Tukey post hoc tests at 5% were performed for the incubation time, chitosan concentration, molecular weight of chitosan, and percentage of growth inhibition PIC%. It was found that only time has statistical significance in the growth of *T. asperellum*, and instead, for the growth of *M. roreri*, the time, concentration of chitosan and molecular weight of chitosan have statistical significance. In conclusion, *T. asperellum* co-encapsulated with chitosan in the biopolymeric particle presents antagonistic activities against *M.roreri* with a PIC% of around 40% for the majority of assays with the different concentrations and molecular weights of chitosan. Chitosan did not inhibit the growth of *T. asperellum*. On the other hand, the inhibition on the phytopathogen was comparable with *T. asperellum* without encapsulation, which is an advantage to evaluate the applications of this new biological control in cacao crops in Ecuador. However, the strain did not present mycoparasitic activity when the phytopathogen was in advanced development in the Petri dishes.

Key words: biological control, Cacao, *T. asperellum*, *M. roreri*, chitosan, particle, encapsulation, antagonism, mycoparasitism, PIC%.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	15
2. JUSTIFICACIÓN	18
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo General	20
3.2. Objetivos Específicos	20
4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	21
4.1. Cacao en el Ecuador	21
4.2. Moniliasis	22
4.2.1. Métodos de Control de Moniliasis en el Ecuador.	23
4.2.1.1. Control Genético	23
4.2.1.2. Podas Culturales.	23
4.2.1.3. Control Químico.	24
4.2.1.4. Control Biológico.	25
4.3. Moniliophthora roreri	25
4.3.1. Características Macroscópicas.....	25
4.3.2. Características Microscópicas.....	26
4.4. Trichoderma	27
4.4.1. Morfología	28
4.4.2. Características Macroscópicas.....	28
4.4.3. Características Microscópicas.....	29
4.4.4. Trichoderma como agente de control biológico (BCA) en la agricultura.....	30
4.4.5. Mecanismos de acción de Trichoderma spp. frente a fitopatógenos.....	32
4.4.5.1. Antibiosis.....	32
4.4.5.2. Micoparasitismo.....	33
4.4.5.3. Competencia.....	34
4.5. Encapsulación de microorganismos en biopolímeros	35
4.6. Quitosano	38
5. METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA EXPERIMENTACIÓN	41
5.1. Diseño Experimental	41
5.2. Lugar de la investigación	42
5.3. Materiales y Equipos	42
5.3.1. Vidrio.....	42
5.3.2. Químicos.....	42
5.3.3. Equipos.....	42
5.4. Medios de cultivo usados	43
5.4.1. Medio para <i>Trichoderma asperellum</i>	43
5.4.2. Medio para <i>Moniliophthora roreri</i>	43
5.5. Cultivo de Cepa de Trichoderma asperellum	44
5.6. Cultivo de Cepa de Moniliophthora roreri	44
5.7. Preparación y conteo de Solución de T. asperellum	45
5.8. Extracción de Quitosano	45
5.8.1. Obtención y acondicionamiento de exoesqueleto de camarón.	45
5.8.2. Desmineralización.	46
5.8.3. Desproteínización.	46
5.8.4. Obtención del Quitosano.	46
5.8.5. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar.....	47

5.8.6.	Caracterización de quitosano por FTIR.....	48
5.8.7.	Comprobación de encapsulación de quitosano por espectroscopía infrarroja.....	49
5.9.	Elaboración de partículas biopoliméricas con <i>T. asperellum</i> y quitosano co-encapsulados.	49
5.10.	Evaluación de la capacidad antagónica de <i>T. asperellum</i> encapsulado.....	50
5.11.	Evaluación de micoparasitismo.....	52
5.12.	Análisis estadísticos.....	54
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
6.1.	Caracterización de quitosano extraído por viscosimetría capilar	55
6.2.	Caracterización de quitosanos por FTIR.....	57
6.3.	Comprobación de encapsulación de quitosano por IR	60
6.4.	Pruebas de antagonismo por cultivos duales	61
6.4.1.	Prueba de antagonismo con quitosano de bajo peso molecular QTL (177.13 kDa).....	61
6.4.2.	Prueba de antagonismo con quitosano de peso molecular medio QTM (381.84 ± 11.29 kDa). 51	51
6.4.3.	Prueba de antagonismo con quitosano de peso molecular alto QTH (812.69 ± 7.93 kDa). 54	54
6.5.	Micoparasitismo	77
7.	CONCLUSIONES.....	81
8.	RECOMENDACIONES.....	82
9.	REFERENCIAS.....	83
10.	ANEXOS.....	101
10.1.	Partícula biopolimérica con <i>T. asperellum</i> y quitosano encapsulado	101
10.2.	Partículas formadas en solución de ácido acético y cloruro de sodio.	102
10.3.	Quitosanos utilizados.....	103
10.4.	Conteo de conidios de <i>T. asperellum</i> en la cámara de Neubauer	104
10.5.	Protocolo de elaboración de partículas biopoliméricas	105
10.6.	Gráficas de caracterización por viscosimetría capilar.....	106
10.6.1.	Quitosano extraído.....	106
10.6.2.	Quitosano de Sigma(Chitosan from Shrimp Shells).	107
10.6.3.	Quitosano de Aldrich (Low molecular Weight).....	108
10.6.4.	Quitosano de China(Color café).....	109
10.6.5.	Quitosano de China(Color amarillo).....	110
10.7.	Micoparastismo con partícula de <i>T. asperellum</i> y QTH co-encapsulados.....	111
10.8.	Análisis Estadísticos	112

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Resumen de los pesos moleculares obtenidos para los quitosanos analizados.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 2: Quitosanos seleccionados para pruebas de antagonismo y micoparasitismo.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 3: Porcentaje de Desacetilación de los quitosanos evaluados.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 4: Prueba de Antagonismo (cultivos duales con M. royeri) con partícula de quitosano QTL (177.13 ± 4.75 kDa).....</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 5: Prueba de Antagonismo (cultivos duales con M. royeri) con partícula de quitosano QTM (381.84 ± 11.29 kDa).....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 6: Prueba de Antagonismo (cultivos duales con M. royeri) con partícula de quitosano QTH (812.69 ± 7.93 kDa).....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 7: Control de crecimiento radial de M. royeri a 30°C en V8.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 8: Control de crecimiento de M. royeri con partículas únicamente con quitosano encapsulado.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabla 9: Control de crecimiento de M. royeri con quitosano encapsulado.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 10: Control de T. asperellum sin encapsular y T. asperellum encapsulado.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 11: Prueba de micoparasitismo con partícula de T. asperellum y QTL co-encapsulados.....</i>	<i>78</i>
<i>Tabla 12: Control de T. asperellum sin encapsular y T. asperellum encapsulado en micoparasitismo.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabla 13: Peso molecular calculado para el quitosano extraído en el Laboratorio de Química de la Universidad San Francisco de Quito.....</i>	<i>106</i>
<i>Tabla 14: Peso molecular calculado para el Quitosano de Sigma (Chitosan from shrimp shells).....</i>	<i>107</i>
<i>Tabla 15: Peso molecular calculado para el Quitosano de Aldrich (Low molecular weight).....</i>	<i>108</i>
<i>Tabla 16: Peso molecular calculado para el Quitosano de China (Color Café).....</i>	<i>109</i>
<i>Tabla 17: Peso molecular calculado para el Quitosano de China (color amarillo).....</i>	<i>110</i>
<i>Tabla 18: Prueba de micoparasitismo con partícula de T. asperellum y QTM co-encapsulado.....</i>	<i>111</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Moniliophthora roreri en medio V8. Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 2: Hifas de Moniliophthora roreri vistas en el microscopio(40X). Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 3: Trichoderma asperellum en medio PDA tomada en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 4: Hifas de Trichoderma asperellum vista en el microscopio(40X). Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 5: Esquema general de encapsulación de hierro (Fe) y nanomagnetita NMT mediante gelificación iónica (Dong-Wan et al, 2015) .</i>	<i>37</i>
<i>Figura 6: Estructura química de quitina y quitosano (De Alvarenga, 2011).....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 7: Ubicación de las partículas con T. asperellum y quitosano co-encapsulados en forma de rombo sobre M. roreri para ensayos de micoparasitismo.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 8: Espectros infrarrojo para QTM, QTH, QTL, QTC.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 9: Espectro infrarrojo de QTA y quitina.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 10: Espectros infrarrojos de KBr (blanco) y de partículas con quitosano encapsulado al 0.25%. Las flechas señalan las bandas de vibración de aminas primarias correspondientes a la molécula de quitosano.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 11: Cinética de crecimiento de T. asperellum encapsulado en partículas con QTL, en prueba de cultivo dual con M. roreri.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 12: Cinética de crecimiento de T. asperellum encapsulado en partículas con QTM, en prueba de cultivo dual con M. roreri.</i>	<i>53</i>
<i>Figura 13: Cinética de crecimiento de T. asperellum encapsulado en partículas con QTH, en prueba de cultivo dual con M. roreri.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 14: Crecimiento de M. roreri bajo el control de partícula únicamente con quitosano encapsulado al 0.25%.</i>	<i>60</i>
<i>Figura 15: Cinética de crecimiento de M. roreri en el control con quitosano al 0.25%.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 16: Cinética de crecimiento de T. asperellum sin encapsular y T.asperellum encapsulado.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 17: Comparación de cinéticas de crecimiento de T. asperellum en pruebas duales con partículas biopoliméricas con QTL, QTM y QTH al 0.10%.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 18: Comparación de cinéticas de crecimiento de T. asperellum en pruebas duales con partículas biopoliméricas con QTL, QTM y QTH al 0.25%.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 19: Comparación de cinéticas de crecimiento de T. asperellum en pruebas duales con partículas biopoliméricas con con QTL, QTM y QTH al 0.50%.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 20: PIC% de M. roreri por partículas biopoliméricas de T. asperellum con quitosano encapsulado y controles en el sexto día.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 21: Viscosidades reducidas en función de concentración de quitosano extraído y ecuaciones lineales obtenidas.</i>	<i>106</i>
<i>Figura 22: Viscosidades reducidas en función de concentración de quitosano de Sigma(Chitosan from Shrimp Shells) y ecuaciones lineales obtenidas.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 23: Viscosidades reducidas en función de concentración de quitosano de Aldrich (Low molecular Weight) y ecuaciones lineales obtenidas.....</i>	<i>108</i>
<i>Figura 24: Viscosidades reducidas en función de concentración de quitosano de China(Color café) y ecuaciones lineales obtenidas.</i>	<i>109</i>
<i>Figura 25: Viscosidades reducidas en función de concentración de quitosano de China (color amarillo) y ecuaciones lineales obtenidas.</i>	<i>110</i>
<i>Figura 26: ANOVA calculado por SPSS cuando la variable dependiente es el crecimiento de T.asperellum.....</i>	<i>112</i>
<i>Figura 27: Prueba de Tukey al 5% evaluando la concentración de quitosano.</i>	<i>112</i>
<i>Figura 28: Prueba de Tukey al 5% evaluando el peso molecular de quitosano.....</i>	<i>113</i>
<i>Figura 29: Prueba de Tukey al 5% evaluando el tiempo de incubación de los cultivos duales.....</i>	<i>113</i>
<i>Figura 30: ANOVA calculado por SPSS cuando la variable dependiente es el crecimiento de T.asperellum.....</i>	<i>114</i>
<i>Figura 31: Prueba de Tukey al 5% evaluando la concentración de quitosano.</i>	<i>114</i>
<i>Figura 32: Prueba de Tukey al 5% evaluando el peso molecular de quitosano.....</i>	<i>115</i>

<i>Figura 33: Prueba de Tukey al 5% evaluando el peso molecular de quitosano.....</i>	<i>115</i>
<i>Figura 34: Crecimiento de T.asperellum con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de bajo peso molecular</i>	<i>116</i>
<i>Figura 35: Crecimiento de T.asperellum con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de alto peso molecular.....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 36: Crecimiento de T.asperellum con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de peso molecular medio.....</i>	<i>117</i>
<i>Figura 37: Crecimiento de M.roreri con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de peso molecular bajo.....</i>	<i>117</i>
<i>Figura 38: Crecimiento de M.roreri con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de peso molecular medio.....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 39: Crecimiento de M.roreri con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de peso molecular alto.....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 40: ANOVA calculado por SPSS para el porcentaje de inhibición de crecimiento radial.....</i>	<i>119</i>
<i>Figura 41:Gráfico de barras de PIC% para los diferentes tratamientos realizados en el antagonismo de M. roreri.....</i>	<i>120</i>

1. INTRODUCCIÓN

Para quienes están sumergidos en la industria de plantas y las utilizan sea como materia prima vegetal para la producción y distribución de productos generados a base de ésta ó solamente en la producción de plantas con fines alimenticios, el concepto del buen crecimiento de plantas es de gran importancia para los agricultores, trabajadores agrícolas, y en definitiva para todas los seres vivos que somos consumidores directos de los frutos que provienen de la tierra.

El crecimiento de plantas depende de factores primordiales como la disponibilidad de agua, nutrientes del suelo, condiciones de humedad, temperatura e incidencia de energía. Pero por otra parte, está el desarrollo ineficiente de las plantas provocado por la infertilidad del suelo, plagas de insectos, malezas, y agentes fitopatógenos. Estos últimos son aquellos organismos que provocan enfermedades en las plantas, un tipo importante de estos agentes son los hongos.

Los hongos son organismos microscópicos que carecen de clorofila y se reproducen asexualmente mediante esporas. Alrededor de 100 000 especies de hongos han sido estudiados y de este número 8 000 provocan enfermedades en plantas. Entre los efectos que provocan están: la muerte de los tejidos vegetales, atrofia de plantas completas, y crecimiento excesivo de sus órganos (Agrios,1991). En el Ecuador, Pico, Calderón y Fernández (2012) exponen que las plantaciones de cacao, uno de los principales rubros de la industria agrícola nacional, son afectadas por problemas fitosanitarios ocasionados por hongos como la *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora sp*, y *Moniliophthora perniciosa*.

La *Moniliophthora roreri* es el hongo que produce la enfermedad llamada Moniliasis, pudrición acuosa o helada en el Ecuador. Esta enfermedad fúngica es severa, ya que se conoce que logra producir pérdidas desde un 25% hasta la pérdida total de la producción sino se la

controla (Jaimes & Aranzazu, 2010). El hongo ataca a frutos en cualquier estado de desarrollo y con mayor incidencia a frutos de corta edad. Los síntomas empiezan con el apareamiento de manchas de tono amarillo y pardas. Posteriormente, en condiciones favorables como de humedad, se observa el crecimiento de micelio en forma de felpa blanca hasta causar la putrefacción completa de la mazorca de cacao (Pico, Calderón & Fernández, 2012).

Dentro del Ecuador se maneja varias prácticas para prevenir en mayor medida enfermedades como esta. Entre dichas prácticas están: la resistencia genética del material de siembra, prácticas culturales (control de malezas, podas de mantenimiento, remoción de frutos enfermos), control químico, y control biológico con agentes antagonistas (Pico, Calderón & Fernández, 2012). Siendo el control químico con agentes cúpricos, el método más fácil y eficiente. Pero por otro lado, el control biológico se ha intensificado en los últimos años debido a la importancia que se ha dado a los efectos negativos de los agroquímicos en el hombre y al medioambiente. El control biológico tiene como objetivo la eliminación del organismo considerado como nocivo y se basa en interacciones negativas entre el agente biocontrolador y el patógeno. *Trichoderma spp.* ha sido uno de los hongos antagónicos más estudiados para el control de enfermedades y para la producción de inoculantes (Ferrera & Alarcón, 2007).

A la par de los avances en el desarrollo de controles biológicos, polímeros naturales como el quitosano han sido también estudiados. Este compuesto que es extraído mayormente de exoesqueletos de crustáceos ha tenido gran impacto debido a sus propiedades bacteriostáticas y actividades fungiestáticas (Gritshc et al, 2018). Pruebas *in vitro* de quitosano de bajo peso molecular presentaron un efecto de inhibición en el crecimiento de cepas de hongos como *Candida spp.* que produce infecciones en humanos (Albuquerque et al, 2010). El efecto de quitosano con cepas del género *Trichoderma spp.* han sido también analizados, Zavala-González et al (2016) encontraron que la cepa *T. koningiopsis* era capaz de tolerar

concentraciones altas de quitosano a diferencia de otras como *T. harzianum*, *T. neocrassum*. Esto ha generado el interés de estudiar la relación de dicho compuesto en conjunto con *Trichoderma spp.* como alternativas en el control biológico.

En la actualidad y con guía del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP, únicamente se ha realizado un estudio con dos cepas de *Trichoderma spp.* en el Ecuador. Entre los resultados obtenidos, se encontró que tanto las cepas *Trichoderma koningiopsis* como *Trichoderma stromaticum* redujeron la moniliasis de manera similar a fungicidas probados como la Azoxistrobina y óxido de cobre (Hidalgo & Suárez, s/f). Es por eso que, debido a la potencialidad del *Trichoderma spp.*, en el presente trabajo se investiga la acción antagónica de *Trichoderma asperellum* como biocontrolador encapsulado en una partícula biopolimérica frente al hongo fitopatógeno *Monilophthora roreri*.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente demanda de agroproductos causada por la necesidad de incrementar la producción de alimentos, el uso de pesticidas se ha intensificado en los últimos años. Los pesticidas son compuestos químicos usados para controlar, matar, y repeler plagas de insectos, microbios, malas hierbas, nemátodos, y mamíferos en los cultivos. El uso en grandes proporciones de este tipo de compuestos comenzó desde 1940, ya que permitía acabar fácilmente con las plagas, pero ha sido justamente la competencia y la gran demanda de productos alimenticios que han llevado a provocar el uso desmesurado de pesticidas en plantaciones. Consecuentemente, han traído efectos negativos para los seres vivos y el ambiente.

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que alrededor de 200000 muertes al año son producidas por envenenamiento por pesticidas (Odukkathil & Vasudevan, 2013). El envenenamiento es producido durante la manufactura, aplicación, efecto tóxico directo e indirectamente por residuos en comida y en el medioambiente. En un estudio realizado en el cantón Pedro Moncayo en la provincia de Pichincha, donde laboran alrededor de 600 plantas florícolas, se encontró que en el día de la madre, época de gran uso de pesticidas en flores, la exposición de los niños a pesticidas cuyas residencias eran cercanas de las floriculturas, causaban alteraciones a corto plazo en su rendimiento neurocomportamental (Suarez-Lopez et al, 2017).

Debido a este tipo de problemas que acarrea el uso de pesticidas, una alternativa para controlar la peste Moniliasis provocada por el fitopatógeno *Moniliophthora roreri* en las plantaciones de Cacao de Ecuador y disminuir el uso de pesticidas y sus efectos, es la generación de un nuevo mecanismo basado en el control biológico. El presente estudio se basa en este tipo de control, a través de la formación de una partícula biopolimérica a base del polímero quitosano que encapsule el hongo *Trichoderma asperellum* y realizar las respectivas pruebas de

antagonismo y micoparasitismo con el fitopatógeno *Moniliophthora roreri*. La formación de la partícula biopolimérica se la hace con el objeto de generar protección a las células de *Trichoderma asperellum*. La partícula es formada mediante el método de gelificación iónica, formando una matriz. En, este caso, la partícula se estructura mediante el entrecruzamiento de una solución de alginato de sodio que se expone a una solución que contiene el catión divalente calcio, Ca^{2+} .

Este método que forma geles altamente ordenados fue ya observado en 1955 por Thiele y Andersen (1955) y hasta el año 2013 alrededor de 2500 artículos fueron publicados con temas relacionados a la encapsulación. En consecuencia, una gran cantidad de estudios posteriores comprobarían que estas matrices que pueden encapsular agentes microbiológicos, permiten la protección del agente de factores de estrés bióticos y abióticos (luz UV, contaminación, temperatura, estrés mecánico, antagonistas del suelo) logrando una extensión de la vida de las células y la prolongación de la actividad metabólica (Vemmer & Patel, 2013).

Por otro lado, el quitosano, que también estará encapsulado en la partícula, es un polímero natural proveniente de la desacetilación de quitina encontrada en exoesqueletos de crustáceos y es reconocido por su potencial antibacterial (Al-Najada & Gherbawy, 2015). La importancia de su vinculación junto a *Trichoderma* spp., es debido a que las enzimas expulsadas por el hongo como las quitinasas en procesos como micoparasitismo, son activadas en presencia de quitina y derivados como el quitosano (López-Mondéjar et al, 2012). Por lo cual, las partículas biopoliméricas pueden ser una nueva alternativa eficiente para probar el control biológico de la Moniliasis en la plantas de cacao en el Ecuador.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Analizar los efectos antagónicos y micoparasitarios del control biológico de partículas biopoliméricas de *Trichoderma asperellum* con quitosanos de diferente pesos moleculares frente al fitopatógeno *Moniliophthora roreri*.

3.2. Objetivos Específicos

1. Extraer quitosano de exoesqueleto de camarón.
2. Caracterizar el quitosano extraído y otros quitosanos comerciales mediante viscosimetría capilar para determinar el peso molecular.
3. Elaborar partículas biopoliméricas de alginato de sodio que encapsulen *Trichoderma asperellum* y quitosano.
4. Realizar las pruebas de antagonismo y micoparasitismo de las partículas biopoliméricas con diferentes concentraciones de quitosano , y con 3 diferentes quitosanos de peso molecular alto, medio, y bajo.
5. Analizar los resultados estadísticamente y determinar las condiciones apropiadas para el antagonismo y micoparasitismo de *Trichoderma asperellum* encapsulado en las partículas biopoliméricas con quitosano.

4. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

4.1. Cacao en el Ecuador

Cacao es una planta perteneciente al género *Theobroma* de la familia *Esterculiáceas*, y es uno de los cultivos más importantes en la industria mundial, ya que provee productos como el chocolate y la cocoa (Erukainure et al, 2010). *Theobroma cacao* es una planta de las selvas tropicales de Sudamérica y América Central. Expertos botánicos sostienen que el cacao habría nacido hace 3000 o 4000 años en la Amazonía y el Orinoco. De ahí, la planta migró hacia Yucatán donde comenzarían las primeras plantaciones. Luego, poco tiempo después de la colonización española los granos serían llevados hacia el continente Europeo (Cevallos, 2005).

A partir de la segunda mitad del siglo XVI el negocio del cacao en el Ecuador comienza a crecer. Es en 1880 que las haciendas cacaoteras obtiene un rápido desarrollo en las zonas de los Ríos, el Oro, y el Guayas. De hecho, para el año de 1904 la costa ecuatoriana vendría a ocupar el puesto de mayor productora y exportadora de cacao a nivel mundial.

Sin embargo, para 1916 las condiciones del cacao habían cambiado. El precio del quintal en sures disminuyó y durante la primera Guerra Mundial las exportaciones de cacao a nivel nacional bajaron rotundamente. Y para los años 1916 las plantaciones fueron afectadas por enfermedades como la Moniliasis y Escoba de Bruja, las cuales, debido a las condiciones económicas deficientes no pudieron controlarse (Cevallos, 2005).

En años posteriores, el Ecuador tendría únicamente el 2% de las exportaciones mundiales y no es hasta el año 1960 con las reformas agrarias que nuevamente las plantaciones retomarían una recuperación. En la actualidad, para el año 2017 el Ecuador ha logrado exportar alrededor de 250 mil toneladas métricas de cacao con un record de 260 mil en el 2015 (Anecacao, 2017).

4.2. Moniliasis

La Moniliasis es una de las enfermedades más destructivas del cacao presente en 11 países latinoamericanos (Philips-Mora, 2006). En Perú, la enfermedad ataca a frutos en cualquier etapa de desarrollo causando pérdidas entre 16 al 80%. En Colombia, esta enfermedad fúngica es el limitante de las producciones logrando, donde tienen pérdidas hasta del 70 % (Fedecacao, 2004).

La primera detección del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* causante de la enfermedad fue en Quevedo, Provincia de Los Ríos, Ecuador (FHIA,2003; Najjar & Thomas, 2001). Aunque Philips-Mora et al (2006), mencionan que su primera detección fue en Colombia. Ésta enfermedad es también conocida como pudrición acuosa, helada, mancha ceniza o enfermedad de Quevedo. La enfermedad se desarrolla a una altitud entre 0 y 1520 m.s.n.m, con mayor incidencia en épocas de precipitación fluvial y a un rango de temperatura de 18 a 28°C (Phillips, 2006; IICA, 2006). La contaminación por el patógeno se da por el esparcimiento de los conidios a través del viento y del agua de lluvia, a cortas distancias entre plantaciones (Albuquerque et al, 2005). La mayor cantidad de esporas del hongo se encuentran a 1 metro de altura en las plantas de cacao (Melendez, 1993).

Los síntomas de la enfermedad son internos y externos en las mazorcas de cualquier edad. Los síntomas externos se evidencian mediante una necrosis, deformación y pudrición de las mazorcas, lo que causa la muerte del fruto, haciéndolo de color café oscuro, hasta formar un recubrimiento de esporas de color crema (Johnson et al, 2008). Los síntomas internos son más dañinos, los tejidos centrales, pulpa, semillas y a veces la cáscara conforman una sola masa que son rodeados con una sustancia acuosa debido a la descomposición (IICA,2006). En frutos de dos meses de edad, la infección crea protuberancias en la superficie del fruto, ésta se descolora y va tornándose color café, luego aparece la felpa blanca o micelio hasta que en el séptimo día nacen las esporas de color crema y el fruto está totalmente muerto (FHIA, 2003).

4.2.1. Métodos de Control de Moniliasis en el Ecuador.

En el Ecuador, el control de la Moniliasis se da mediante, un conjunto de métodos que conforman el manejo integrado de las enfermedades del cacao.

4.2.1.1. Control Genético .

Con el avance de estudios biológicos se ha logrado entender la resistencia genética a través de métodos moleculares. Se ha identificado que el cacao es una especie que tiene 10 pares de cromosomas (Montoya, 2010), donde 28 798 genes codifican proteínas, el 82% de estos genes están anclados en los diez cromosomas del cacao, haciendo posible el estudio de procesos evolutivos.

Gracias a la identificación genómica se ha motivado la búsqueda y producción de clones con resistencia y tolerancia genética a la enfermedad. En la Amazonía del Ecuador se recomienda la utilización de clones tipo Nacional Fino de Aroma: EET-95, EET-103, Y EET-576 (Pico et al, 2012).

4.2.1.2. Podas Culturales.

En este tipo de control se evita la entrada del fitopatógeno mediante prácticas como aplicación de abonos, construcción de canales de drenaje y podas fitosanitarias.

La aplicación de abono es una actividad que responde al hecho de que en la zona centro de la Amazonía Ecuatoriana los suelos disponibles para plantaciones de cacao presentan deficiencias

en nutrientes y pH ácidos. El desbalance nutricional y pH menores a 5.5 hacen a las plantas más susceptibles a la enfermedad. Se debe controlar el aplicación de nutrientes como N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Fe, Mn, B.

Los canales de drenaje se realizan debido a las altas precipitaciones (3000-3500 mm/año) que se dan en la Amazonía. Sin la evacuación del agua se asfixian las plantas, evitando el buen funcionamiento fisiológico de la misma.

Finalmente, las podas de ramas muertas y mal ubicadas se realizan 3 a 4 veces al año en época de menor intensidad de lluvias. Y más importantes aún, la poda de ramas y frutos enfermos cada dos meses. Los frutos con síntomas son removidos semanalmente y puestos en la calle en zonas de incidencia de luz solar con el objetivo de evitar el esparcimiento de esporas (Pico et al, 2012).

4.2.1.3. *Control Químico.*

Como su nombre lo indica, el control químico hace uso de compuestos químicos como fungicidas a base de cobre. Dependiendo de la zona agroecológica, este control se inicia cuando las mazorcas de cacao tienen 4 a 5 centímetros de largo. Las dosis de fungicidas pueden ser de 1 a 2.5 kg/ha cuando son sólidos en forma de polvo o 250 cc/ha cuando se utilizan soluciones. El intervalo de aplicación es cada 22 días hasta completar 5 aplicaciones (Pico et al, 2012).

4.2.1.4. Control Biológico.

El control biológico es un método de control de plagas y microorganismos utilizando organismos vivos. En Ecuador, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ha trabajado con hongos antagónicos del género *Trichoderma spp.* Solis y Suárez-Capello (2010) encontraron que las cepas *T. koningiopsis* y *T. stromaticum* redujeron la moniliasis de forma similar que fungicidas como Azoxystrobina (Pico et al, 2012).

4.3. Moniliophthora roreri

Moniliophthora roreri fue descrita por primera vez por Ciferri y Parodi (1933) de mazorcas de cacao muertas en el Ecuador. Es el hongo causante de la enfermedad moniliasis que afecta a las plantaciones de cacao en Ecuador y en países vecinos del continente Sur Americano. Este hongo pertenece al género himenomiceto *Crinipellis* (Basidiomiceto) (Evans et al, 2003).

4.3.1. Características Macroscópicas.

El micelio alcanza un espesor de 2 a 3 milímetros. El hongo crece muy lentamente en agar, colonias de 8 a 15 milímetros se forman después de 2 semanas. En medio V8 la tasa de crecimiento es de 1.3 a 6.2 milímetros por día y la esporulación comienza desde los 5 hasta los 13.8 días. El micelio es lanudo en forma de felpa, de color rosado al principio, y finalmente se torna de color café madera o de tono arcilloso (Evans, 1978).



Figura 1: *Moniliophthora roreri* en medio V8. Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ.

4.3.2. Características Microscópicas.

Las hifas son de paredes delgadas e irregulares con espesor de 1.5 a 5 micrómetros de ancho. Las hifas están formados por conidióforos ramificados, y de conidios fácilmente separables de color amarillo pálido y de color marrón en masa (Evans, 1978).

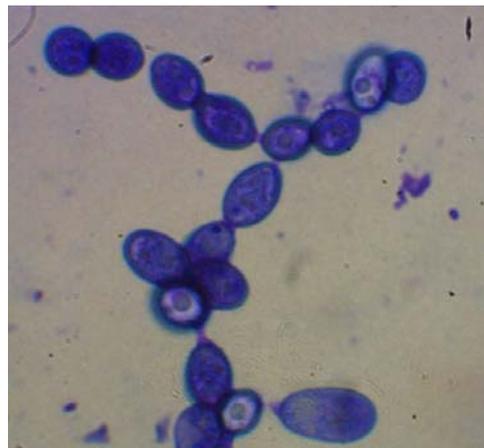


Figura 2: Hifas de *Moniliophthora roreri* vistas en el microscopio (40X). Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ.

4.4. Trichoderma

El género *Trichoderma* es un grupo de hongos de tipo ascomiceto de esporulación verde que puede ser encontrado en un gran rango de zonas climáticas a un gran intervalo de temperaturas en todo el mundo. Debido a su rápido crecimiento se lo encuentra sobre materia vegetal muerta y principalmente en la rizosfera de las plantas (Hui, 2013).

La capacidad de habitar diferentes ecosistemas se da gracias a una alta tasa reproductiva, diversidad metabólica, y a la competitividad que presentan las diferentes cepas en la naturaleza frente a otros microorganismos (Cardoso-Lopez et al, 2012). Es capaz de desarrollarse en temperaturas desde los 7.7°C hasta los 42°C anaerobiamente (Muñoz, 2012), aunque la temperatura ideal de crecimiento es entre 25 a 30 °C (Ruano et al, 2003).

Entre la gran variedad de nichos donde se puede hallar *Trichoderma spp.*, los más importantes han sido los suelos de tipo agrícola debido a la presencia de hongos de la tierra como su presa y a la cantidad de nutrientes provenientes de las raíces de plantas (Druzhinina et al, 2011). También se ha encontrado su presencia en zonas acuáticas donde se ha reportado que se asocian a esponjas marinas como las *Agelas dispar* (Neumann et al, 2007), pero es en su mayoría en nichos agrícolas donde se han identificado molecularmente alrededor de 200 especies de *Trichoderma spp.* (Atanasova et al, 2013), y la importancia de identificarlas se ha dado por el impacto positivo que han conllevado sobre dichos suelos.

La presencia de estos hongos sobre habitats de agricultura han permitido usarlos como agentes de biocontrol para prevenir enfermedades en plantas cultivadas, pues mejoran el crecimiento de estas, inducen resistencia a enfermedades y además permiten la degradación de pesticidas (Harman, 2006). Por lo cual, gran parte de la investigación y descubrimientos llevados

a cabo a partir de los años 70 del siglo pasado hasta la actualidad, se han enfocado en estudiar a *Trichoderma* para producir fertilizantes y biofungicidas (Vinale et al, 2008) .

4.4.1. Morfología

El término *Trichoderma* fue por primera vez usado en 1794 (Persoon, 1974) y luego en 1865 por Tulasne y Tulasne (1865) quienes lo vincularon al género *Hypocrea*. Pues se reconoció que el género *Trichoderma* era el estado sexual anamórfico de los hongos de tipo *Hypocrea*. Sin embargo, las especies que se asociaban a *Hypocrea/Trichoderma* no se distinguían morfológicamente de manera fácil para ese entonces, y fue hasta 1969, donde se desarrolló un método de identificación efectivo (Rifai, 1969) y, a partir de allí, varias especies han sido identificadas. Actualmente las cepas de *Trichoderma* se identifican mediante el código de barras de oligonucléotidos TrichOKEY o una herramienta similar llamada TrichoBLAST (Druzhinina et al, 2005) que se encuentran accesibles en el internet. Mediante estas herramientas la distinción morfológica y taxonómica se ha hecho mucho más simple.

4.4.2. Características Macroscópicas

Trichoderma spp. es cultivado en agar de papa (PDA) en platos Petri. El crecimiento rápido de colonias comienza con un coloración casi transparente a una temperatura de incubación de entre 20-30 °C. A partir del quinto día se presenta la formación de una red de felpa blanca conocida como micelio, que es capaz de poblar toda la superficie del agar. Una vez que la red de micelio se hace presente, la exposición a la luz hace que las colonias cambien de coloración

desde un tono amarillo-verdoso hasta un tono completamente verde oscuro como se observa en la Figura 3.



Figura 3: *Trichoderma asperellum* en medio PDA tomada en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ.

4.4.3. Características Microscópicas

Las células de *Trichoderma* están formadas por 3 estructuras: conidióforos, fiálides, y conidios. En la mayoría de especies los conidióforos presentan la forma de ramificaciones en intervalos regulares formando pirámides. Las fiálides son ramificaciones más pequeñas que están infladas en la base y sostienen en sus terminales a los conidios cuya forma es elipsoidal. Los conidios unicelulares miden de entre 2-5 μm y tienen coloraciones verdes (Kubicek & Harman, 2002).



Figura 4: Hifas de *Trichoderma asperellum* vista en el microscopio(40X). Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ.

4.4.4. *Trichoderma* como agente de control biológico (BCA) en la agricultura.

En el control biológico se usa uno o más organismos vivos para controlar la población de plagas o enfermedades en los cultivos. Varios estudios de organismos antagonistas se han realizado contra fitopatógenos de plantas, el 90% de estos han sido llevados a cabo con diferentes cepas del género *Trichoderma spp.*

La habilidad de las diferentes cepas de *Trichoderma spp.* para atacar al fitopatógeno se basa en una secuencia y cooperación de mecanismos de crecimiento quimiotrópico en el ecosistema y del contacto directo con el hongo fitopatógeno.

Por un lado, la gran capacidad de adaptación y colonización de los diferentes tipos de nichos ecológicos les permiten interactuar con los organismos a su alrededor. Así se sabe que cepas selectas de *Trichoderma* son capaces de promover el crecimiento de las plantas al aumentar la superficie de la raíz haciendo que esta tenga mayor adquisición de nutrientes (Harman et al, 2004).

Por otro lado, están los mecanismos a los cuales acuden al enfrentarse contra un fitopatógeno. Estos mecanismos son micoparasitismo, antibiosis, competición, producción de enzimas líticas y producción de metabolitos secundarios (Vinale et al, 2007) . Todos estos mecanismos hacen que la actividad de *Trichoderma* como agente de control biológico ó BCA(sus siglas) sea una mezcla compleja y dependa de las condiciones fisico-químicas del ambiente donde se encuentren.

Entre otras características que hacen a *Trichoderma spp.* un gran BCA frente a otros hongos del suelo, es la resistencia contra componentes tóxicos secretados por microflora de suelo, plantas, fungicidas, herbicidas y antibióticos (Benítez et al, 2004). La resistencia se da gracias a la expresión de transportadores ABC o cassetts de unión de ATP cuya acción es la de reducir la acumulación de componentes tóxicos en su pared celular (Harman et al, 2004).

Entre los actores de control biológico (BCAs) dentro de este género estan *T. virens*, *T. viride*, y sobresaliendo de todos ellos *T. harzianum* (Benítez et al, 2004). Alrededor de quince cepas de *Trichoderma spp.* fueron aisladas en diferentes regiones del Ecuador (Guayas, Pichincha, Riobamba, Santo Domingo) y fueron identificadas como *T. harzianun*, *T. asperellum*, *T. virens*, y *T. reesei*. Varias de estas cepas presentaron buenas actividades antagónicas contra hongos fitopátogenos como *Fusarium oxysporum f sp.*, *Mycosphaerella fijensis* que produce la la Sigatoka Negra del banano, *Moniliophthora Roreri* que provoca la Moniliasis del cacao, y *Moniliophthora pernicioso* que causa la enfermedad escoba de bruja de igual forma en siembras de cacao (Galarza et al, 2015).

Cuatro aislados de *T. asperellum* (PR10, PR11,PR12, PR659-7) presentaron porcentajes de inhibición de entre 70-80% en pruebas de antagonismo y micoparasitismo contra del hongo *Phytophthora megakarya*. *P. megakarya* es un hongo que produce la enfermedad conocida como *black pod* que ataca fuertemente a las plantaciones de cacao en Camerún. Se encontró a la vez

que las cepas mejoraron el crecimiento de la planta al inducir la acumulación de compuestos fenólicos y ciertos aminoácidos que la planta de cacao necesita en sus mecanismos de defensa (Nguemezi et al, 2017).

En Queensland (Australia), *T. harzianum* y *T. virens* presentaron también actividades antagonistas en contra de *Mycosphaerella musicola*, *Cordana musae*, y *Deigtoniella torulosa*, enfermedades que afectan a las hojas de las plantas de banano (Samuelian, 2016). También en Kerman (Iran), 20 aislados de *T. harzianum* obtenidos de la rizosfera de árboles sanos de pistacho mostraron índices de inhibición del micelio del hongo *Verticillium dahliae*, el cual produce *Verticillium*, una de las enfermedades más devastadoras en la huertas de pistachos alrededor del mundo (Fotoohiyan et al, 2017).

4.4.5. Mecanismos de acción de *Trichoderma spp.* frente a fitopatógenos.

4.4.5.1. Antibiosis.

La antibiosis es aquel mecanismo basado en la producción de metabolitos de bajo peso molecular de tipo antibióticos secretados por microorganismos que reducen el crecimiento y las actividades metabólicas del otro microorganismo. Al darse la antibiosis, los patógenos atacados por los metabolitos presentan inhibición de esporulación, reducción del crecimiento del micelio, y retardo en la germinación de esporas (Ellis et al, 1999).

El experimento clásico para analizar el mecanismo de la antibiosis consta en medir sobre la placa de agar el porcentaje de inhibición en base al crecimiento radial del micelio del hongo de control biológico sobre el fitopatógeno (Ferrera & Alarcón, 2007).

Las especies de *Trichoderma* son capaces de producir compuestos volátiles y no volátiles que inhiben el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno. Dennis y Webster (1971b) identificaron que varios aislados de *Trichoderma* producen componentes con olor a coco. Dicha substancia causa la inhibición de crecimiento de hongos como *Rhizoctonia solani* en períodos tan cortos como de un día. El compuesto fue identificado como *6-n-pentyl- 2H-pyran-2-one* (Merlier et al, 1984; Claydon et al 1987; Ghisalberti et al , 1990).

Claydon et al. (1987) examinaron dos cepas de *T. harzianum* las cuales presentaban el aroma a coco del compuesto mencionado y se lo caracterizó como un buen compuesto antifúngico. En estudios contemporáneos a los que habían encontrado Claydon et al., otras cepas de *T. harzianum* presentaban la formación de compuestos péptidos hidrofóbicos. Estos compuestos son antifúngicos y están formados por mezclas de 9 y 7 compuestos ácidos (Merlier et al, 1984; Bodo et al, 1985; El Hajji et al, 1987).

Antibióticos producidos por *T. koningii* fueron identificados como trichoviridinas, isonitrinas y compuestos con isocianuros (Tamura et al, 1975). Las trichoviridinas se activan en presencia de bacterias como *Escherichia Coli* (Yamano et al, 1970). El compuesto 6-pentenil- α – *pirona* excretado por *T. viride* presenta propiedades inhibitoras contra el hongo *Phytophthora cinamomi* (Claydon et al, 1987) .

4.4.5.2. Micoparasitismo.

Se define al parasitismo como la asociación entre grupos de organismos heterotróficos que involucra una relación nutricional donde se favorece el organismo parásito (Barnet,1964). La interacción hongo antagónico y hongo fitopatógeno es denominada micoparasitismo para diferenciar del parasitismo con bacterias.

El componente más importante dentro del micoparasitismo es la producción de enzimas, pues son estas las que producen debilitamiento de las paredes celulares de los fitopatógenos actuando sinérgicamente (Weller & Thomashow, 1993a).

Trichoderma tiene la capacidad de percibir al hongo fitopatógeno y dirigir su crecimiento para atacarlo. Este comportamiento es el inicio del micoparasitismo. No existe evidencia sobre el origen molecular de las señales que permiten a *Trichoderma* dar inicio a este mecanismo, pero se tiene la hipótesis que enzimas hidrolíticas mandan moléculas de regreso hacia *Trichoderma* para comenzar el ataque (Gupta et al, 2014).

Cambios morfológicos ocurren en las hifas de *Trichoderma* al formar estructuras penetrantes y que permiten la producción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar paredes celulares (Herrera & Chet, 2003). Las enzimas hidrolíticas más importantes en la degradación son: quitinasas, glucanasas, N-acetilglucosaminidasas, y proteasas.

Cepas de *T. asperellum* mostraron la actividad de $\beta - 1,3 - \text{glucanasa}$ en la reducción de la densidad de apotecia para el control de *S.sclerotiorum* bajo condiciones de campo (Geraldine et al, 2013). De forma parecida, cepas de *T.Asperellum* TC74 y Th1 mostraron la actividad de enzimas endoquitinasas, N-acetilglucosaminidasa, y $\beta - 1,3 - \text{glucanasa}$ en el parasitismo contra *Phymatotrichopsis omnivora* el hongo que afecta a cultivos de algodón, maní, manzanas, y duraznos (Guigón-López et al, 2015).

4.4.5.3. Competencia.

La competencia por nutrientes, espacio, y lugar de infección es un mecanismo importante en el control biológico. Pero es la similitud de hábitos alimentarios tanto del hongo antagonista como del hongo fitopatógeno que constituye la base de la competencia (Alexandrova et al, 2003; Ellis et al, 1999; Hwang & Benson, 2001; Marx, 1972; Nelson, 1990; Parke et al, 1991; Shankar

et al, 1994; Sneh, 1998; Suslow & Schrtoh, 1982; Thomashow & Weller, 1996; Van Loon & Van Loon et al, 1998; Zak, 1964). Sustratos solubles de carbono, nitrógeno, hierro son algunos de los componentes más importantes para dicha competencia (Handelsmann & Stabb, 1996; Kilian et al, 2000; Nelson, 1990, Parke et al, 1991; Sneh, 1998; Suslow & Scrotch, 1982; Van Loon & Van Loon et al, 1998). Si estos componentes están presentes en la rizosfera, el hongo antagonista es capaz de competir por dichos nutrientes y evitar la germinación del fitopatógeno.

El hierro generalmente se encuentra insoluble en el suelo, pero bacterias y hongos tienen sistemas especiales para aprovechar dicho metal. *Trichoderma spp.* ha sido capaz de competir por hierro al suprimir a *Fusarium spp.* Se ha hipotizado que competición por Fe es un factor crucial en el control biológico de *T.asperellum* contra *Fusarium* (Segarra et al, 2010).

Por otro lado, el pH de suelo es un factor fundamental en el desarrollo de comunidades microbiológicas en el suelo y por ende en el aprovechamiento de nutrientes. Se ha visto que a pH 7 y más básicos, *T. virens* presenta una disminución en el control de hongos como *Sclerotia* (Gupta et al, 2014).

4.5. Encapsulación de microorganismos en biopolímeros

Debido a los crecientes estudios y desarrollos de agentes para control biológico, formulaciones con diferentes compuestos para su aplicación se han ido desarrollando. La encapsulación es uno de los métodos más aplicados en el manejo de microorganismos y ha existido desde la década de 1950 (Green, 1950).

La encapsulación tiene el principal objetivo de crear una matriz que proteja al agente de control biológico contra estrés bióticos y abióticos como contaminación, temperatura, antagonistas del suelo, radiación UV, y sequía. Lo que hace que se extienda la vida del

organismo y además que su actividad metabólica sea mayor. Además, dependiendo del material del cual está hecho la matriz de encapsulación las células de los organismos pueden ser liberadas lentamente a medida que el material se degrada (Vemmer & Patel, 2013).

Los materiales adecuados para encapsular son polímeros biodegradables. Alguno de los polímeros naturales más usados son agar, alginatos, gomas, almidón, celulosa, pectina, carragenina, y quitosano (Wandrey et al, 2010).

Solo algunos métodos de encapsulación son apropiados para el manejo de células vivas de microorganismos, los cuales aplicados para agentes de control biológico. La mayoría de métodos de encapsulación para los BCAs involucran la gelificación iónica utilizando alginatos (Connick, 1988).

La gelificación iónica se da cuando una cantidad de solución de alginato de sodio, pectinato de sodio o gomas que contienen agentes vivos de control biológico se deja caer sobre una solución de entrecruzamiento que contiene cationes divalentes como por ejemplo Ca^{2+} . La forma más común del biopolímero una vez formado es en forma de esfera y se les denomina perlas, partículas o beads, su término en inglés. La solidificación de la partícula de alginato se da en cuestión de milisegundos cuando en la superficie de la partícula los cationes reaccionan con las cadenas del biopolímero formando una estructura tridimensional rígida (Vemmer & Patel, 2013).

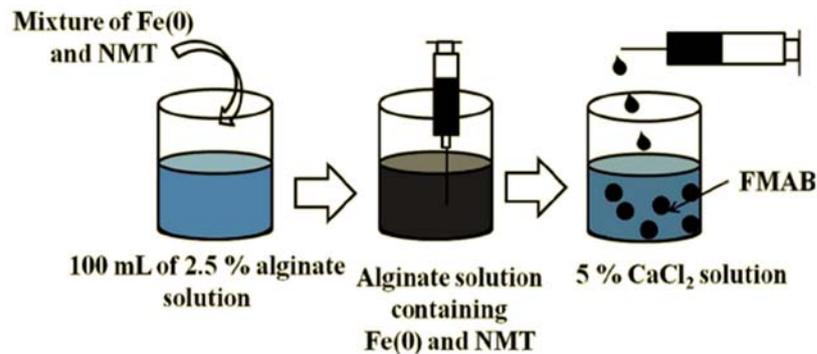


Figura 5: Esquema general de encapsulación de hierro (Fe) y nanomagnetita NMT mediante gelificación iónica (Dong-Wan et al, 2015) .

Así, *Trichoderma spp.* fue encapsulado mediante este método con diferentes polímeros en una solución de alginato al 2% (p/v). La viabilidad de los conidios del hongo a temperatura de 28 °C se mantuvieron por 14 meses (Locatelli et al, 2017).

Bacillus thuringiensis var. Israelensis, un biocida utilizado en el control de pestes de mosquitos, fue encapsulado también en alginato de sodio. Se encontró que la viabilidad de la matriz con el compuesto larvicida es de hasta 10 años (Prabakaran & Hoti, 2008).

Esporas de *Trichoderma harzianum* y *Glomus spp.* fueron inmovilizadas en perlas de alginato de sodio, mediante condiciones in vitro se evaluó el crecimiento del hongo fuera de la matriz. El hongo fue capaz de crecer a partir de la partícula. Hifas del hongo fueron ya observadas en el día tres (De Jaeger et al, 2011).

Aunque la gelación con alginato es el mejor método de encapsulación de BCAs, otros métodos como: partículas huecas (hollow beads), coacervación compleja, gelificación termal, recubrimiento capa por capa, secado por pulverización, son utilizados en la encapsulación de células vivas y antibióticos en la industria farmacéutica, biomedicina, y con avances hacia la aplicación biotecnológica (Vemmer & Patel, 2013).

4.6. Quitosano

La quitina es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza y es usado principalmente en la obtención de quitosano a través del proceso de desacetilación. Cada año alrededor de 100 billones de toneladas de quitina son producidos en la naturaleza por crustáceos, moluscos, hongos e insectos. Y se encuentra como el mayor compuesto del exoesqueleto de animales marinos invertebrados (Azuma et al, 2015; Khan et al, 2007).

La quitina está formada por unidades de *N* – *acetilglucosamina* que forman cadenas de gran peso molecular, y se caracteriza por tener propiedades antibacteriales, antifúngicas, de biodegradabilidad, y por ser biocompatible. Sin embargo, tiene una limitada solubilidad lo cual la hace menos útil y cede toda la atención al quitosano (Sayari et al, 2016).

Quitosano puede ser obtenido a partir de la quitina por vía enzimática o vía química. El proceso químico conocido como desacetilación, es el más fácil debido a su bajo costo y a su facilidad para su reproducción en masa (Younes & Rinaudo, 2015).

Para obtener quitosano primeramente se debe extraer la quitina. A nivel industrial la quitina es extraída mediante dos pasos principales: a) la desproteización de la materia prima mediante una solución alcalina y b) una desmineralización con solución ácida. Una vez obtenida la quitina, el paso final es la desacetilización (Philibert et al, 2017). Para la desacetilización, se trata a la quitina con una solución de hidróxido de sodio concentrada (50-60% p/v) a temperaturas de entre 80 a 100 °C . El tiempo de reacción es sumamente rápido de aproximadamente 2 horas.

Tras la desacetilación, el quitosano formado resulta ser un copolímero constituido por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosaminas unidos por enlaces $\beta - 1,4$ glucosídicos. El cociente entre dichas unidades se conoce como grado de desacetilación. Cuando el grado de desacetilación es mayor a 50%, el quitosano entonces se hace soluble debido a que los grupos

aminos presentes (con pKa de 6.2 a 7) son completamente protonados en medios ácidos. Así, quitosano es insoluble en agua, solventes orgánicos, y soluciones básicas. Y es soluble luego de agitarse en soluciones de ácidos como nítrico, acético, clorhídrico, perclórico y fosfórico (De Alvarenga, 2011).

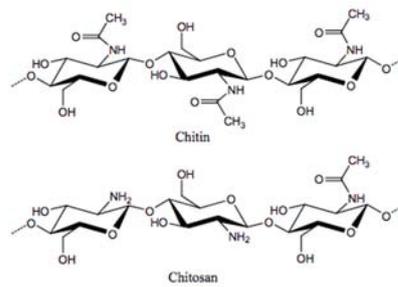


Figura 6: Estructura química de quitina y quitosano (De Alvarenga, 2011).

La solubilidad del quitosano ha hecho posible su presencia en varias aplicaciones. Ha sido utilizado en la producción de films, hidrogeles, y nanofibras en biomedicina. Estructuras soportes, andamios, con concentraciones de células mesenquimales (MSC) y quitosano han sido estudiados in vitro en animales, como método para posteriores aplicaciones en el tratamiento de lesiones de la placa de crecimiento para evitar deformaciones en el desarrollo de extremidades en niños (Azarpira, 2015).

Los films de nanocompuestos con quitosano y arcilla han sido probados como soportes de enzimas proteolíticas para evitar el oscurecimiento por proteínas en la producción de vinos (Benucci et al, 2018).

Hidrogel en forma de partículas de alginato y quitosano fueron usados para encapsular proteína BSA o alúmina sérica bovina para mejorar la nutrición de peces en el área de la

acuicultura. El quitosano de bajo peso molecular fue usado y se encontró que daba buena protección contra las condiciones ácidas del estómago de los peces (Sáez, 2015).

Otra aplicación del biopolímero es en el área de la biotecnología, la capacidad antimicrobiana y antifúngica que tiene el quitosano es dada por la carga catiónica que obtiene los grupos amino de la cadena del polímero. Esta gran carga positiva es capaz de unirse a las cargas aniónicas de las paredes celulares de bacterias, lo que forma una especie de barrera evitando el paso de nutrientes. Se ha reportado que el quitosano inhibe el crecimiento de bacterias como *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Lactobacillus fructivorans* (Papineau et al, 1991).

La capacidad antifúngica también ha sido de interés en el desarrollo de biocontroles. Estudios han demostrado que el quitosano posee dicha actividad antifúngica contra hongos, y que depende básicamente del peso molecular, por las cadenas de sus unidades y por ende de su grado de desacetilación (Hirano & Nagao, 1989). En la actividad antifúngica, un mecanismo similar al de la bacteria ha sido propuesto, donde el quitosano se une a las paredes celulares de los hongo y causa fuga de material intracelular (El Ghaouth et al, 1991).

El quitosano de bajo peso molecular fue probado en contra el crecimiento de *Leptographium procerum* y *Sphaeropsis sapinea* y se encontró que tiene un efecto fungiestático. En cambio, quitosano frente a una cepa de *Trichoderma harzianum* no provocó cambios en el crecimiento (Chittenden & Singh, 2009). Por lo cual, la tolerancia de *Trichoderma* frente a quitosano es interesante de notar y estudiar.

Se ha encontrado que enfermedades causadas por el hongo *Fusarium oxysporum spp.* en plantas de tomates fueron reducidas mediante aplicación en aerosol foliar del *Trichoderma harzianum* con quitosano. Las concentraciones de quitosano con mejores resultados en la severidad de la enfermedad fueron de 0.5 y 1 [g/L] (El-Mohamedy & Abdel- Kareem, 2014).

5. MÉTODOLÓGÍA Y DISEÑO DE LA EXPERIMENTACIÓN

5.1. Diseño Experimental

Se realizaron 51 ensayos de pruebas de antagonismo y 51 ensayos de micoparasitismo de *Moniliophthora roreri* con *Trichoderma asperellum* co-encapsulada con quitosano en formulaciones de partículas de alginato, y diferentes controles que se especifican a continuación.

Ensayos Antagonismo	Ensayos Micoparasitismo
Ensayos de cultivo dual con partículas con <i>T. asperellum</i> co-encapsulado con quitosano de bajo peso molecular al 0.10, 0.25, y 0.50% p/v.	Ensayos de micoparasitismo con partículas con <i>T. asperellum</i> co-encapsulado con quitosano de bajo peso molecular al 0.10, 0.25, y 0.50% p/v.
Ensayos de cultivo dual con partículas con <i>T. asperellum</i> co-encapsulado con quitosano de peso molecular medio al 0.10, 0.25, y 0.50% p/v.	Ensayos de micoparasitismo con partículas con <i>T. asperellum</i> co-encapsulado con quitosano de peso molecular medio al 0.10, 0.25, y 0.50% p/v.
Ensayos de cultivo dual con partículas con <i>T. asperellum</i> co-encapsulado con quitosano de alto peso molecular al 0.10, 0.25, y 0.50% p/v.	Ensayos de micoparasitismo con partículas con <i>T. asperellum</i> co-encapsulado con quitosano de alto peso molecular al 0.10, 0.25, y 0.50% p/v.
Partículas de control solamente con quitosano encapsulado para cada peso molecular al 0.25% p/v.	Partículas de control solamente con quitosano encapsulado para cada peso molecular al 0.25% p/v.
Partículas de control solamente con <i>T. asperellum</i> encapsulado.	Partículas de control solamente con <i>T. asperellum</i> encapsulado.
Control de quitosano al 0.25% p/v para cada quitosano.	Control de quitosano al 0.25% p/v para cada quitosano.
Control de <i>T. asperellum</i> .	Control de <i>T. asperellum</i> .

5.2. Lugar de la investigación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Química y en los laboratorios de Biotecnología Agrícola y Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito.

5.3. Materiales y Equipos

5.3.1. Vidrio.

Botellas de reactivo de borosilicato fueron utilizados durante toda la investigación. Las botellas y tapas fueron lavadas rigurosamente con detergente líquido. Se enjuagaron con agua destilada y se esterilizaron las soluciones en autoclave.

5.3.2. Químicos

Se utilizó ácido acético al 99% y ácido clorhídrico al 37% v/v. El pH de las soluciones se ajustó a 5.0 utilizando NaOH 1M.

5.3.3. Equipos

Condensador de vidrio, botella de reactivo de 1000 mL y mangueras de plástico fueron utilizados para el ensamblaje del sistema de reflujo en la extracción de quitosano. Se utilizó un viscosímetro de Ostwald para la caracterización de quitosano. La cámara de siembra de *Trichoderma spp.* fue empleada en el repicado de la cepa para la esporulación del hongo en placas Petri. Las cámaras de flujo laminar clase II fueron utilizadas para la dispensación de medio PDA, medio V8, repicado y siembra del fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, y pruebas de antagonismo y micoparasitismo. Microscopio (aumento 40X) fue utilizado para observar las

hifas de los hongos y conteo de conidios de *Trichoderma asperellum*. Una incubadora fue utilizada para incubar las placas Petri con los ensayos de antagonismo y micoparasitismo. Las mediciones de peso de reactivos fueron hechas en una balanza analítica. El equipo IR fue usado para la caracterización de partículas biopoliméricas. La cámara de Neubauer fue utilizada para el conteo de conidios de *T. asperellum*.

5.4. Medios de cultivo usados

5.4.1. Medio para *Trichoderma asperellum*.

El agar de papa dextrosa ó PDA. fue usado para el crecimiento del hongo.

5.4.2. Medio para *Moniliophthora roreri*.

El medio V8 fue usado para el crecimiento del hongo y para las pruebas de antagonismo y micoparasitismo.

Componentes	Cantidad [g/L]
Jugo V8	200 mL
Maltosa	20
Asparagina	1
Extracto de Malta	10
$CaCO_3$	3
Agar-Agar	15

5.5. Cultivo de Cepa de *Trichoderma asperellum*

La cepa de *Trichoderma* utilizada fue *Trichoderma asperellum* (T-011) del stock de la Universidad San Francisco de Quito. Esta cepa fue aislada en Puembo (Pichincha) en una finca de 40 años de agricultura orgánica en cultivos de brócoli.

Para realizar el cultivo de *Trichoderma asperellum* se tomó una alicuota de 30 uL y en una cámara de siembra, se sembró la cepa en una caja Petri en agar PDA. La caja se llevó a incubación por un periodo de 7 días a 30 °C y luego se dejó dar la reacción fotosintética de esporulación por 3 días a temperatura ambiente y fuera de la cámara.

El material fúngico esporulado de *T. asperellum* de la primera caja fue repicado en otra caja con PDA bajo las mismas condiciones de incubación. El repicado se realizó semanalmente por un periodo de 2 meses.

5.6. Cultivo de Cepa de *Moniliophthora roreri*

Se utilizó la cepa *M.roreri* del stock del laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad San Francisco de Quito. Esta cepa fue aislada en Quevedo (Provincia de los Ríos, Ecuador).

Para el aislamiento de *Moniliophthora roreri*, de una caja previamente esporulada, se llevó a cabo el repicado en la cámara de flujo laminar. El repicado se realizó en un medio V8. Se realizaron tres repicados cada 3 semanas, tiempo en el cual el hongo fitopatógeno colonizaba la caja.

5.7. Preparación y conteo de Solución de *T.asperellum*

Las esporas crecidas en placas Petri de *T. asperellum* fueron cosechadas con medio PDB en la cámara de siembra de *Trichoderma spp.* La solución acuosa con la biomasa fue transferida del plato a un tubo falcón de 25 mL.

Se aplicó la técnica de diluciones seriadas para diluir la solución de *T. asperellum* hasta un máximo de 10^{-2} mL. Con un aumento de 40X en el microscopio, se realizó el conteo de conidios en la cámara de Neubauer utilizando los parámetros de Neubauer Chamber Cell Counting de Celoromics. Ver anexo 10.8.

5.8. Extracción de Quitosano

5.8.1. Obtención y acondicionamiento de exoesqueleto de camarón.

Se obtuvo exoesqueleto de camarón fresco de origen ecuatoriano. Se limpiaron los exoesqueletos de cualquier presencia de materia orgánica (extremidades de camarón, heces, y demás partes procedentes del crustáceo). Se lavó 3 veces las cáscaras con abundante agua y se dejó reposar por 12 horas en solución de hipoclorito de sodio al 0.5%. Se enjuagó los exoesqueletos hasta eliminar el exceso de cloro y se secaron en un horno de convección a una temperatura de 50 °C por 24 horas.

Una vez seco, se molió los exoesqueletos hasta obtener harina con un tamaño de partícula mayor o igual a 2 μm .

5.8.2. Desmineralización.

Con la harina de exoesqueleto de camarón seca, se pesó 50 g y se colocó en 2 litros de ácido clorhídrico 2N en un vaso de precipitación de 4000 mL. La adición del material seco se la hizo lentamente para evitar efervescencia y sobre una plancha de agitación.

Se agitó por 24 horas a temperatura ambiente y luego se decantó la harina desmineralizada y se la lavó con agua destilada utilizando un cernidor de malla fina, hasta que el agua de enjuaje llegó a pH neutro.

5.8.3. Desproteización.

Se mezcló la harina neutralizada con 500 mL de NaOH 2N en un frasco Bodeco de borosilicato 3.3 de 1000 mL. Se agitó en una plancha de calentamiento por 4 horas a una temperatura de 80°C y con un sistema de reflujo para evitar la vaporización del solvente. Seguidamente, se decantó la harina desproteizada y se lavó con agua destilada con un cernidor de malla fina, hasta alcanzar pH neutro.

Finalmente, la harina húmeda se dispuso en una bandeja de aluminio y se secó en el horno de convección a 50 °C por 24 horas. En este punto, el compuesto obtenido del exoesqueleto se denomina quitina.

5.8.4. Obtención del Quitosano.

Se pesó quitina y se mezcló con NaOH al 60% en una relación 1:10 sólido-líquido a 100°C con agitación constante por 6 horas sometido a reflujo. Seguidamente, se decantó la mezcla y se lavó con abundante agua destilada hasta llegar a pH neutro.

Finalmente, la harina húmeda se dispuso en una bandeja de aluminio y se secó en el horno a 50 °C por 24 horas. El compuesto obtenido de la desacetilación de la quitina es el quitosano. Se hicieron pruebas de disolución del compuesto obtenido en una solución de ácido acético 0.1 M.

5.8.5. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar.

El peso molecular (MW) es un parámetro fundamental en la caracterización de polímeros. El MW del quitosano puede ser determinado por técnicas como cromatografía de permeación con gel (GPC), dispersión de luz estática (SLS), y el más sencillo mediante medida de la viscosidad intrínseca (Norzita et al, 2013).

El peso molecular del quitosano se determinó utilizando un viscosímetro capilar de Ostwald y se determinó la viscosidad intrínseca y peso molecular mediante las ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Mohammad, 2007).

Se caracterizaron 5 tipos de quitosanos, el quitosano extraído en el Laboratorio de Química de la USFQ y 4 quitosanos comerciales.

Para solubilizar los diferentes quitosanos se preparó una solución de ácido acético, CH_3COOH , 0.2 M y Cloruro de Sodio 0.1 M al 50 % v/v como solvente. El viscosímetro de Ostwald se mantuvo en condiciones de operación de equilibrio a temperatura de 25 °C durante toda la experimentación mediante un baño termoestático.

Se tomaron los tiempos de caída del quitosano diluido en el solvente con un cronómetro y por triplicado. A partir de ellos, se calculó la viscosidad reducida mediante la siguiente ecuación:

$$\eta_{\text{reducida}} = \frac{t - t_0}{t_0 * C}$$

Donde,

t , tiempo de caída de la solución con quitosano diluido en el viscosímetro.

t_0 , tiempo de caída del disolvente puro en el viscosímetro.

C , concentración de quitosano diluido en el disolvente.

Se realizaron las gráficas de concentración de quitosano en función de las viscosidades reducidas obtenidas. Debido a que la toma de tiempos de caída se realizó por triplicado, se obtuvieron 3 ecuaciones aplicando una línea de tendencia.

A partir de dichas ecuaciones, se encontró la viscosidad intrínseca cuando $t=0$. Finalmente, mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada se despejó el peso molecular con unidades en Daltons.

$$\eta = k * (M_v)^a$$

Donde,

$K = 0.00181$, constante del disolvente a 25 °C.

M_v , peso molecular del quitosano en Dalton [Da].

$a = 0.93$, constante del disolvente a 25 °C (Arevalo, 2016).

5.8.6. Caracterización de quitosano por FTIR

Se caracterizaron quitosanos mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. A partir de la correlación de bandas de vibración de los espectros de FTIR descritas por Escobar et al. (2013), se calculó el porcentaje de desacetilación del quitosano utilizando la siguiente correlación,

$$DA\% = 100 - [31.92 \left(\frac{A_{1318}}{A_{1380}} \right) - 12.20]$$

Donde A, es la absorbancia.

Se tomó como banda de referencia, la banda a 1380 , e grupos metilos, y la banda a 1318 correspondiente a las aminas III, la cual disminuye cuando se desacetila la quitina.

5.8.7. Comprobación de encapsulación de quitosano por espectroscopía infrarroja.

Se utilizó el espectrofotómetro IR modelo 500 de BUCK SCIENTIFIC INC., para comprobar la encapsulación de quitosano en las partículas biopoliméricas. Se fabricó partículas biopoliméricas con quitosano de peso molecular medio (381.84 kDa) al 0.25%. Las partículas fueron liofilizadas por 24 horas para obtener partículas secas. Se utilizó KBr como blanco en el espectrofotómetro y para la fabricación de las pastillas de partículas, se realizó 5 corridas del IR, y los espectros resultantes fueron promediados.

5.9. Elaboración de partículas biopoliméricas con *T.asperellum* y quitosano co-encapsulados.

Las partículas biopoliméricas fueron elaboradas mediante el método de gelificación iónica. Se preparó una solución de ácido acético 0.1 M donde se diluyó quitosano a concentraciones de 0.1, 0.25%, y 0.50% p/v. Se utilizó quitosano de bajo peso molecular (Aldrich), quitosano de peso molecular medio (extraído en el Laboratorio de Química General de la USFQ), y quitosano de bajo peso molecular (Sigma). Una vez diluido el quitosano, se adicionó cloruro de calcio a la

solución para obtener una concentración de 0.2 M. Se preparó una solución de alginato de sodio al 2% p/v. Todas las soluciones fueron esterilizadas en el autoclave por 20 minutos a 121 °C.

De una solución de *T. asperellum*, se realizó el conteo de conidios en la cámara de Neubauer. Se preparó 1 mL de una solución de *T. asperellum* y alginato de sodio en tubos fálcon de 1.5 mL. Se aforó la alícuota adecuada de *T. asperellum* al alginato para obtener una concentración de $1 * 10^6$ conidios . La solución en los tubos de falcón se homogenizaron bien con un vórtex.

En la cámara de flujo laminar clase II, sé colocó la solución de quitosano y $CaCl_2$ sobre una plancha con agitación leve. Con la micropipeta se tomó una alícuota de 30 uL de la solución *T. asperellum*-Alginato y cuidadosamente se dejó gotear en el interior de la solución de quitosano. Las partículas formadas de inmediatamente se sacaron con una espátula pequeña y se lavaron en agua destilada previamente esterilizada. Finalmente las partículas fueron usadas en ensayos de cultivos. Ver anexo 10.5 para mejor apreciación de la elaboración de la partícula.

5.10. Evaluación de la capacidad antagónica de *T. asperellum* encapsulado

Se evaluó el potencial antagónico de *T. asperellum* frente a una cepa de *M. roreri* a través de tres variables: ubicación en la escala de Bell et al.(1982), crecimiento radial del antagonista durante el tiempo de contacto, y el porcentaje de inhibición radial a través del método de cultivo dual en medio V8. Debido a que el antagonista y fitopatógeno tienen diferentes tasas de crecimiento, se ubicaron discos de 5 mm de micelio de *M. roreri* a 1 cm del margen de la placa Petri y se dejaron incubar por 14 días a 30 °C antes de los cultivos duales.

Partículas biopoliméricas de 30 uL encapsulando *T. asperellum* con una concentración de $1 * 10^6$ conidios/mL y concentraciones de quitosano de bajo, medio, y alto peso molecular al

0.1, 0.25, y 0.50 % p/v fueron elaboradas el día del inicio del cultivo dual en el décimo tercer día del crecimiento de los discos de *M. royeri*. La partícula se ubicó al extremo opuesto del disco de *M. royeri* a la misma distancia de 1 cm del margen de la caja. Luego del sembrado de la partícula, las placas fueron incubadas a 30 °C por un periodo de 10 días. Los ensayos se realizaron por triplicado para los tres tipos de quitosano de diferente peso molecular a las 3 diferentes concentraciones dando un total de 27 ensayos.

Para la evaluación del efecto antibiótico de *T. asperellum*, se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PIC) a través de la ecuación utilizada por Skidmore y Dickinson (1976):

$$PIC = \frac{R_1 - R_2}{R_1} * 100$$

donde R_1 es el radio del fitopatógeno en V8 sin antagonista, y R_2 es el radio del fitopatógeno en los ensayos de cultivo dual.

La escala de Bell et al. (1976) permitió evaluar a *T. asperellum* basada en la habilidad de suprimir el crecimiento de *M. royeri*. Las categorías de la escala son:

I: El antagonista crece completamente por encima del fitopatógeno por sobretoda la superficie del cultivo en la caja Petri.

II: El antagonista ocupa al menos 2/3 de toda la superficie del cultivo en la caja petri.

III: El antagonista coloniza la mitad del cultivo en la caja Petri.

IV: El fitopatógeno y antagonista detienen su crecimiento en el punto de contacto.

V: El fitopatógeno crece sobre el micelio del antagonista.

En este ensayo se realizaron 4 controles: en el primer control, se incubó partículas biopoliméricas encapsulando únicamente *T. asperellum* (3 ensayos). El segundo control, se encapsuló en la partícula únicamente los tres tipos de quitosano con concentración media al 0.25% (9 ensayos). El tercer control, se colocaron alícuotas de los tres tipos de quitosano al 0.25% con el mismo volumen de la partícula de 30 uL a la misma distancia del borde de la caja (3 ensayos). En el último control, se colocó alícuotas de *T. asperellum* de 30 uL con la concentración de $1 * 10^6$ conidios/mL a la misma distancia del borde de la caja (3 ensayos).

5.11. Evaluación de micoparasitismo

Micoparasitismo de *T. asperellum* fue evaluado mediante la escala según Royse y Ríes (1978), analizando la colonización del antagonista sobre el micelio de *M. roreri* que creció completamente sobre toda la caja Petri en medio V8. Discos de 5 mm de micelio de *M. roreri* fueron ubicados en la mitad de la caja y se incubaron por 20 días a 30°C antes de los cultivos duales.

Partículas biopoliméricas de 30 uL encapsulando *T. asperellum* con una concentración de $1 * 10^6$ conidios/mL y diferentes concentraciones de quitosano de bajo, medio, y alto peso molecular fueron elaboradas el día del inicio del cultivo dual en el veintavo día del crecimiento de *M. roreri*. Se ubicaron 4 partículas sobre el micelio del fitopatógeno formando un rombo alrededor del disco, cada una a una distancia de 1 cm del margen de la caja.

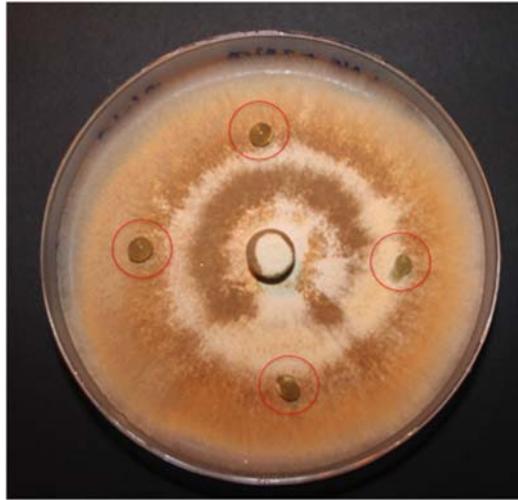


Figura 7: Ubicación de las partículas con *T. asperellum* y quitosano co-encapsulados en forma de rombo sobre *M. roreri* para ensayos de micoparasitismo.

Luego del sembrado de las partículas, las placas fueron incubadas a 30 °C por un periodo de 10 días. Los ensayos se realizaron por triplicado para los tres tipos de quitosano de diferente peso molecular a las 3 diferentes concentraciones mencionadas dando un total de 27 ensayos.

La escala según Royse y Ríes (1978) se divide en grados:

- 1: El antagonista cubre un 100% el micelio del fitopatógeno.
- 2: El antagonista cubre un 75% el micelio del fitopatógeno.
- 3: El antagonista cubre un 50% el micelio del fitopatógeno.
- 4: El antagonista cubre un 25% el micelio del fitopatógeno.

Se realizaron 4 controles: en el primer control, se incubó partículas biopoliméricas encapsulando únicamente *T. asperellum*, en cada plato se colocó las 4 partículas formando el

rombo (3 ensayos). El segundo control, se encapsuló en la partícula únicamente los tres tipos de quitosano con concentración media al 0.25%, en cada plato se colocó las 4 partículas formando el rombo (9 ensayos). El tercer control, se colocaron alícuotas de los tres tipos de quitosano al 0.25% con el mismo volumen de la partícula de 30 uL a la misma distancia del borde de la caja, en cada plato se colocó las 4 alícuotas formando el rombo (3 ensayos). En el último control, se colocó alícuotas de *T. asperellum* de 30 uL con la concentración de $1 * 10^6$ conidios/mL a la misma distancia del borde de la caja, en cada plato se colocó las 4 alícuotas formando el rombo (3 ensayos).

5.12. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se hicieron en el programa estadístico informático SPSS. Se realizó análisis ANOVA con los parámetros de peso molecular de quitosano, concentración de quitosano y días de incubación como influyentes en el crecimiento radial de *T. asperellum* y *M. roreri*. Se realizaron las correspondientes pruebas de Tukey para todos los casos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización de quitosano extraído por viscosimetría capilar

Cinco diferentes quitosanos fueron caracterizados mediante viscosimetría capilar para determinar el peso molecular de cada uno. Dentro de los 5 quitosanos evaluados se encuentra el quitosano extraído en el Laboratorio de Química General de la USFQ (quitosano no comercial), y los 4 quitosanos comerciales.

En el anexo 10.9 se presentan las gráficas de las viscosidades reducidas en función de la concentración de quitosano diluido en CH_3COOH y $NaCl$. Las viscosidades reducidas fueron calculadas a partir de los tiempos de caída de las diferentes concentraciones de quitosano diluidas en la solución solvente para cada uno de los quitosanos usados, utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Mohammad, 2007).

A continuación se muestra una tabla de resumen de los quitosanos analizados con su correspondiente peso molecular obtenido.

Tabla 1: Resumen de los pesos moleculares obtenidos para los quitosanos analizados.

Nº	Quitosano	Peso Molecular [kDa]
1	Quitosano de Sigma (QTH)	812.69 ± 7.93
2	Quitosano Extraído en el Laboratorio (QTM)	381.84 ± 11.29
3	Quitosano de Aldrich (QTM)	177.13 ± 4.75
4	Quitosano de China (QTA)	54.05 ± 7.16
5	Quitosano de China (QTC)	2.63 ± 0.49

De la Tabla 1, los pesos moleculares de los cinco quitosanos analizados estuvieron variadamente distribuidos en un rango de 0 a 1000 kDa. Los quitosanos de China (color café-color amarillo) y quitosano de Aldrich son quitosanos de bajo peso molecular. El quitosano que se extrajo en el laboratorio de Química de la USFQ se lo es caracterizó como quitosano de peso

molecular medio, y finalmente el quitosano proveniente de exoesqueleto de camarón de Sigma es de alto peso molecular. Esto según la escala descrita por Shuai et al (2013), donde quitosano de bajo peso molecular va desde 50-190 kDa, medio desde 190-310 kDa, y alto 310-350 kDa.

Los quitosanos escogidos se muestran a continuación.

Tabla 2: Quitosanos seleccionados para pruebas de antagonismo y micoparasitismo.

Nº	Quitosano	Peso Molecular [kDa]
1	QTH	812.69 ± 7.93
2	QTM	381.84 ± 11.29
3	QTL	177.13 ± 4.75

La razón por la cual se escogió los 3 quitosanos inscritos en la Tabla 2, es debido a que la actividad antimicrobial es directamente dependiente del peso molecular del polímero (Pavinatto et al, 2013). A pesar de que se ha estudiado el mecanismo del efecto antifúngico de quitosano de bajo peso molecular frente a células de hongos (Park et al, 2008), poca literatura está disponible sobre los efectos del peso molecular del quitosano sobre *Trichoderma spp.* Recientemente Zavala et al (2016) reportaron los efectos de quitosano sobre 4 cepas de *Trichoderma*, donde únicamente *T. koningiopsis* se mostró tolerante frente a concentraciones de quitosano mayores a 2000 ug/mL. Y solamente en el 2012, López et al. reportaron que residuos de quitina, incluido quitosano, inducían la expresión de genes que codifican enzimas quitinasas, importantes en los efectos antagonistas de *T. harzianum* como agente de control biológico. Por lo cual, elegir los 3 quitosanos de diferente peso molecular fue una variable decisiva para el estudio del efecto del peso molecular sobre actividades fúngicas del nuevo control biológico.

6.2. Caracterización de quitosanos por FTIR

Se presenta a continuación los espectros infrarrojo para QTL, QTM, QTH, QTA, QTC y se incluye el espectro de la quitina obtenida antes de desacetilar QTM.

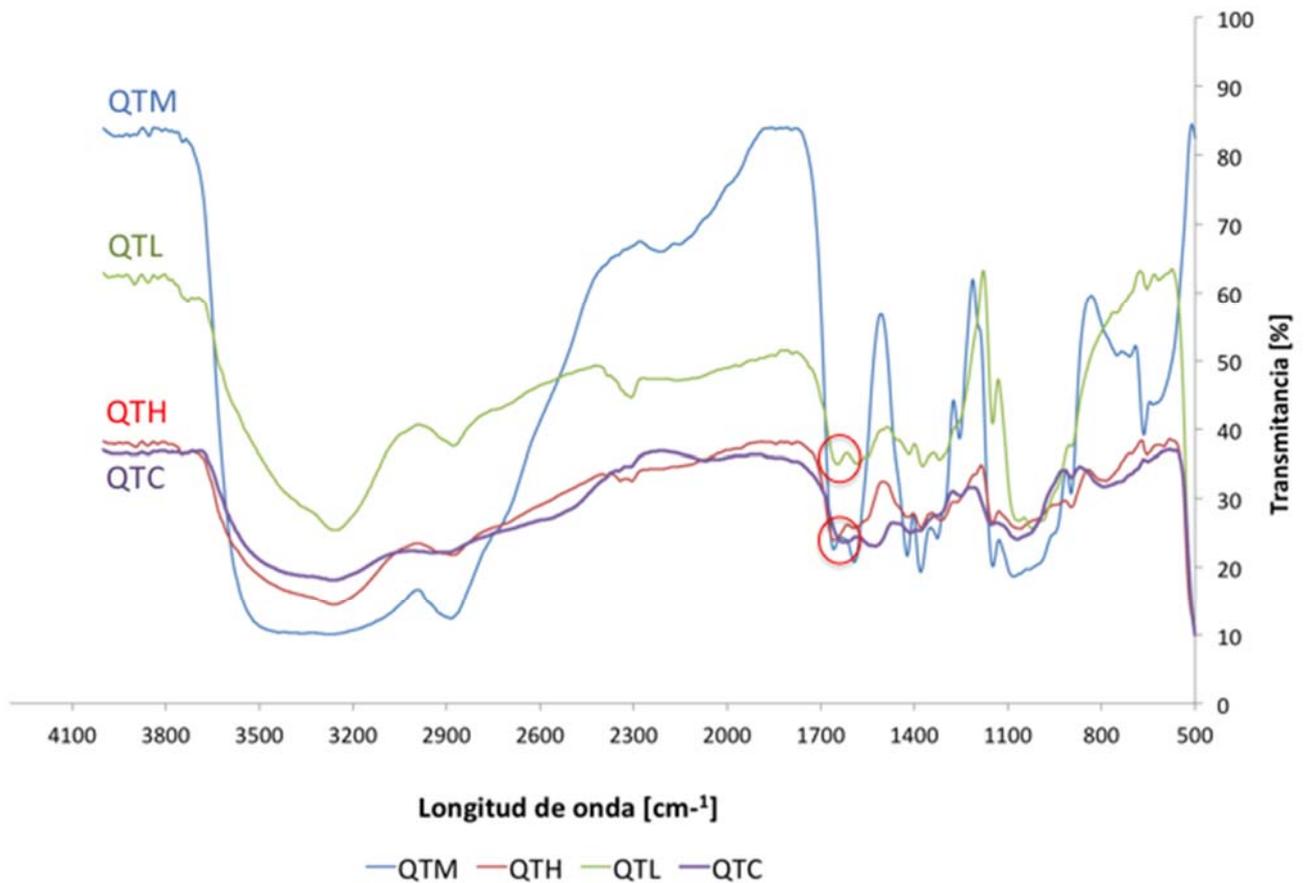


Figura 8: Espectros infrarrojo para QTM, QTH, QTL, QTC.

Se observa en la figura 8 los espectros infrarrojo para 4 quitosanos analizados. En círculos rojos se ha señalado las banda de vibración correspondiente a la amina primaria que caracteriza y verifica la presencia del compuesto quitosano. Para QTL el pico se da a una longitud de onda de 1646 cm^{-1} y a un porcentaje de transmitancia de 35.05%, en QTH el pico se da a una longitud de onda de 1658 cm^{-1} y a un porcentaje de transmitancia de 23.93%, en QTM el pico se da a una

longitud de onda de 1658 cm^{-1} y a un porcentaje de transmitancia de 22.58%, y en QTC el pico se da a una longitud de onda de 1624 cm^{-1} y a un porcentaje de transmitancia de 23.62%.

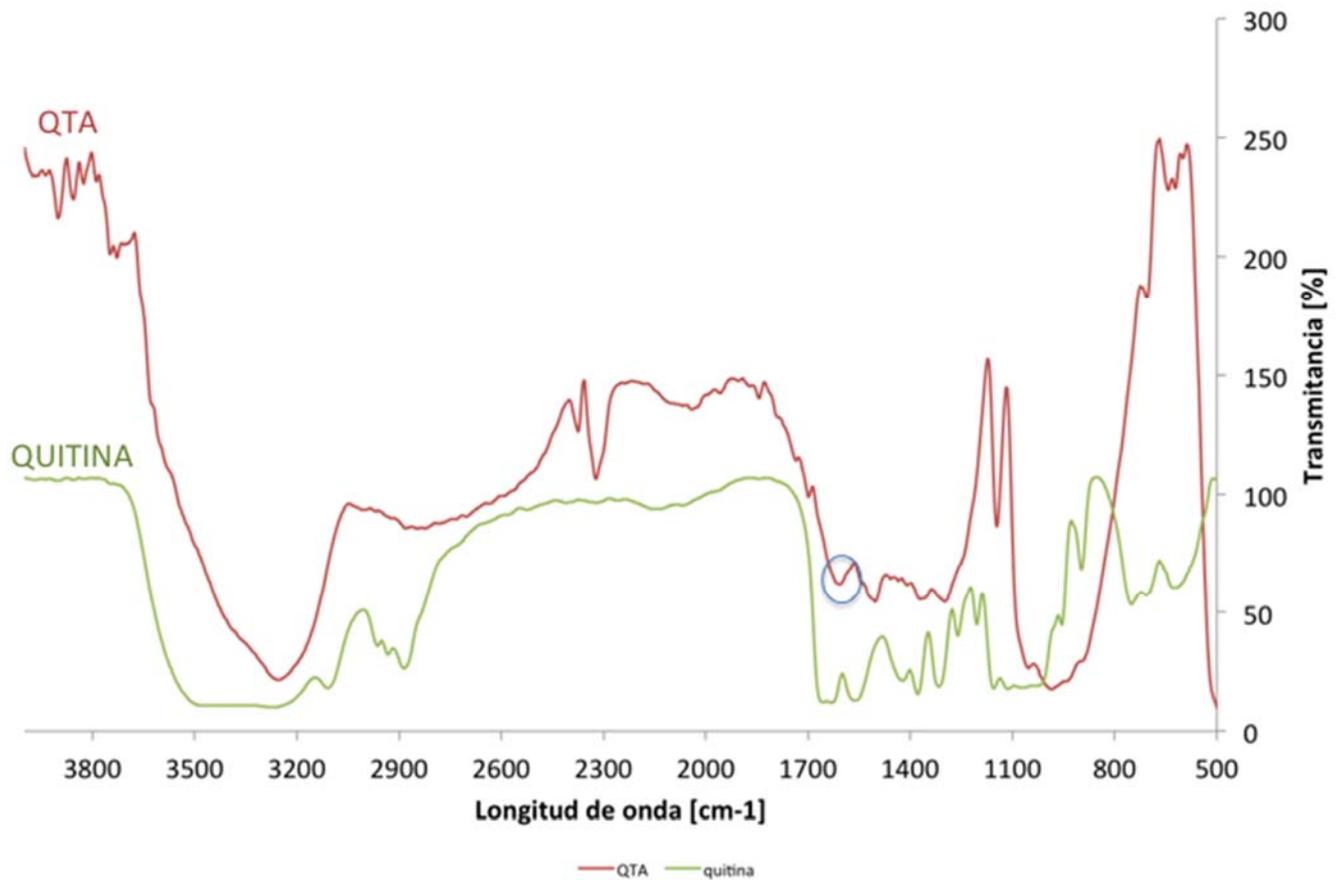


Figura 9: Espectro infrarrojo de QTA y quitina.

Se observa en la figura 9 el espectro infrarrojo para el último quitosano QTA. En el círculo azul se ha señalado la banda de vibración correspondiente a la amina primaria que verifica la presencia del compuesto quitosano a una longitud de onda de 1608 cm^{-1} y a un porcentaje de transmitancia de 61.89%. Además se muestra el espectro de la quitina que se obtuvo antes de la desacetilación de QTM. Se observa que en el rango de longitud de onda entre 1700 a 1600 cm^{-1}

también existe la presencia de picos, por la vibración de la banda de la amina II en la estructura molecular de la quitina, antes de dar paso a la formación de la amina I en el quitosano.

Se muestran los porcentajes de desacetilación calculados para cada quitosano.

Tabla 3: Porcentaje de Desacetilación de los quitosanos evaluados.

Quitosano	Porcentaje de Desacetilación
QTL	80.14%
QTM	80.27%
QTH	79.86%
QTA	80.34%
QTC	79.39%

Los porcentajes para los 5 quitosanos son bastante cercanos, eso corroborará la ubicación tan cercana de los picos en la figura 8. El porcentaje de desacetilación es una muestra del debilitamiento de las bandas de la amina primaria, razón por la cual el pico de quitina en ese rango está más abajo que los demás quitosanos. Debido a que todos los quitosanos tienen grados de desacetilación parecidos se descarta que este parámetro produzca cierto tipo de variación en el estudio.

6.3. Comprobación de encapsulación de quitosano por IR

Para comprobar que el quitosano lograba encapsularse en las partículas biopoliméricas se elaboró partículas con quitosano extraído al 0.25%. Las partículas fueron analizadas por IR. Se muestra a continuación el espectro infrarrojo correspondiente a la pastilla de partícula-KBr. Se señalan las bandas de vibración correspondientes a la flexión del enlace N-H en aminos primarias, en la longitud de onda aproximadamente de 1660 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} . (Dimzon & Knepper, 2015).

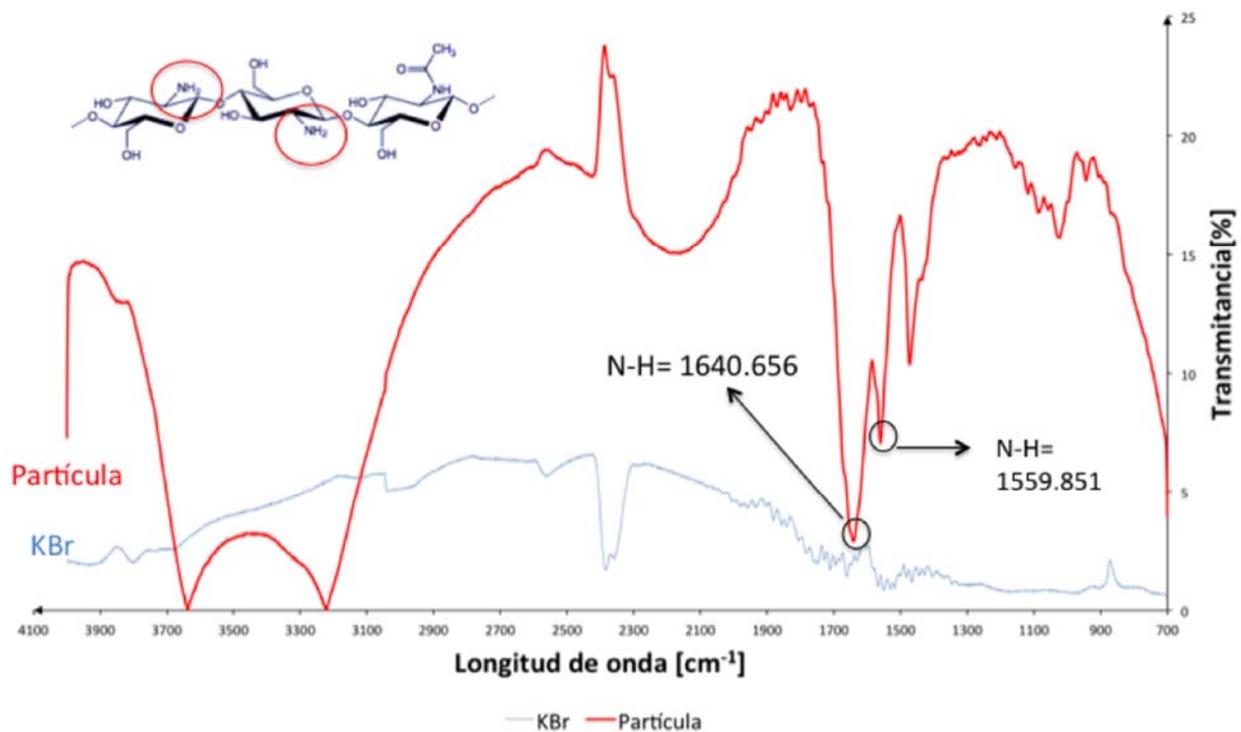


Figura 10: Espectros infrarrojos de KBr (blanco) y de partículas con quitosano encapsulado al 0.25%. Las flechas señalan las bandas de vibración de aminos primarias correspondientes a la molécula de quitosano.

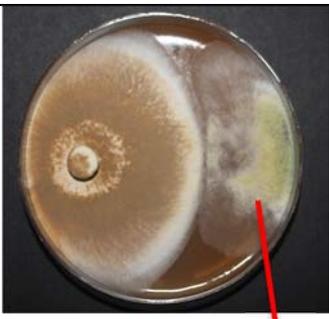
6.4. Pruebas de antagonismo por cultivos duales

Los cultivos duales de antagonismo de *T. asperellum* contra *M. roreri* fueron analizados por un período de 10 días. Los registros del crecimiento radial de ambos hongos fueron tomados diariamente. A continuación se muestra los ensayos con cada quitosano.

6.4.1. Prueba de antagonismo con quitosano de bajo peso molecular QTL (177.13 kDa).

La partícula encapsulada con *T. asperellum* y quitosano fue ubicada en el extremo del disco de *M. roreri* a la misma distancia del extremo opuesto de la caja.

Tabla 4: Prueba de Antagonismo (cultivos duales con *M. royeri*) con partícula de quitosano QTL (177.13 ± 4.75 kDa).

Concentración de QTL(%p/v)	Días de Cultivo			
	0	3	6	10
0.10%				
0.25%				
0.50%				

Disco de *M. royeri*
 Micelio *M. royeri*

Partícula de alginato de sodio con QTL y *T. asperellum* co-encapsulados.

Micelio *T. asperellum* esporulado desde la partícula a los 3 días.

Micelio *T. asperellum* colonizando el micelio de *M. royeri*.

Partícula de alginato de sodio con QTL y *T. asperellum* co-encapsulados.

Se presenta la cinética de crecimiento de *T. asperellum* a través de la partícula con quitosano de bajo peso molecular correspondiente a la tabla 4.

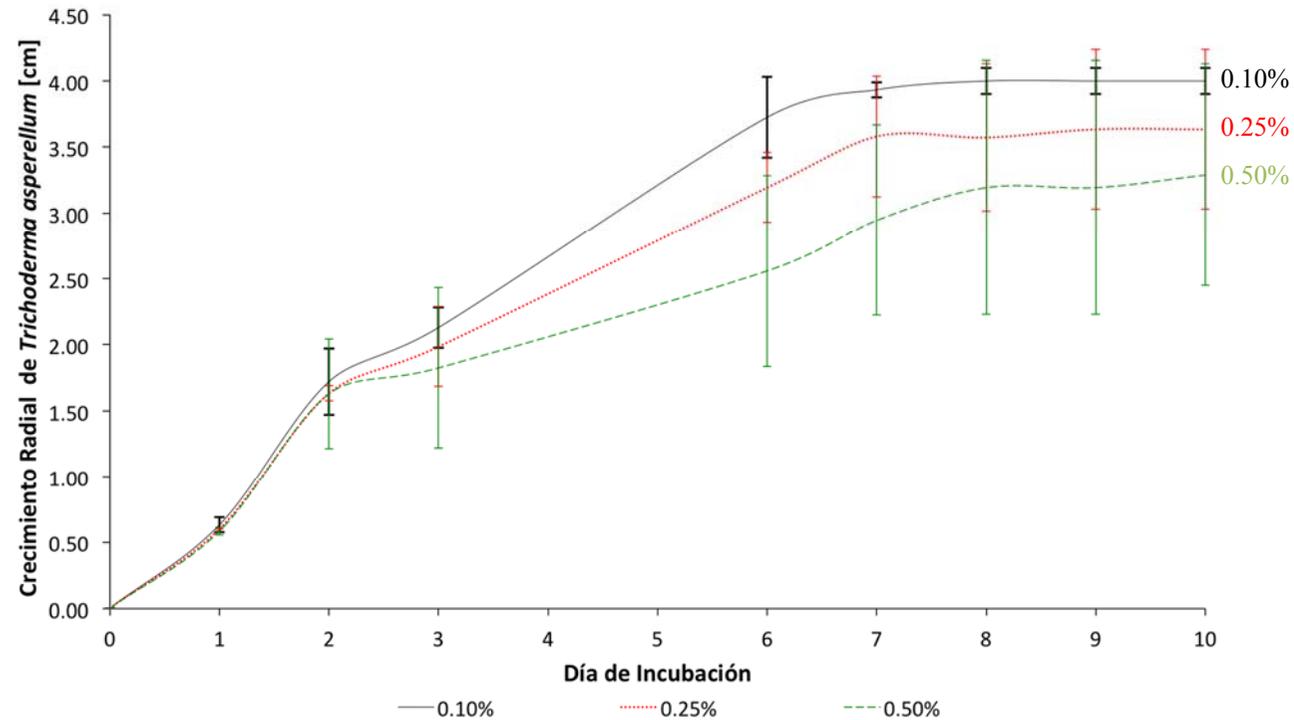


Figura 11: Cinética de crecimiento de *T. asperellum* encapsulado en partículas con QTL, en prueba de cultivo dual con *M. royeri*.

En la tabla 4 se observa que para el tercer día de la siembra, el micelio *T. asperellum* entra ya en contacto con el micelio de *M. royeri*. De la figura 11, los valores de los radio del antagonista van desde 1.82 cm cuando QTL está encapsulado al 0.50% p/v hasta 2.12 cm cuando esta al 0.10% p/v. A partir del contacto, el micelio de *M. royeri* dejó de crecer y para el sexto día se observa que *T. asperellum* coloniza toda la superficie de la caja Petri que no fue ocupada por el fitopatógeno. Se observa entonces la capacidad de la cepa para competir por el espacio y nutrientes. Pues se sabe muy bien que *Trichoderma spp.* aprovecha su rápida tasa de crecimiento para competir por espacio y nutrientes (Simon & Sivasithaparam, 1988).

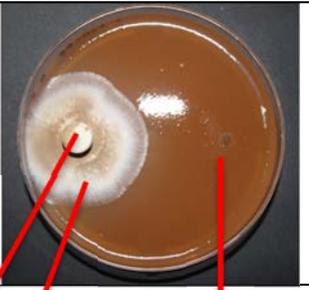
Del sexto día hacia el décimo día de incubación, se observó el mecanismo de micoparasitismo de la cepa. El micelio de *T. asperellum* comenzó a colonizar y esporular sobre el micelio estático de *M. royeri*. A pesar de que no se realizó una microscopía electrónica de las hifas de *T. asperellum* sobre el micelio de *M. royeri* ni tampoco se analizó los metabolitos producidos por el antagonista, el micoparasitismo de la cepa se hace evidente debido al crecimiento de la biomasa del antagonista sobre el patógeno, ya que una de las evidencias de micoparasitismo es el enrollamiento de las hifas de *Trichoderma spp.* sobre las hifas y el consumo del hongo fitopatógeno por parte del antagonista (Gupta et al, 2014).

Finalmente, se observa de la figura 10 que el mayor crecimiento de *T. asperellum* se da cuando QTL es encapsulado con una concentración al 0.10 % p/v donde el radio del antagonista fue de 3.99 ± 0.10 cm en el décimo día. Y el crecimiento radial más bajo fue cuando la partícula encapsuló QTL al 0.50% p/v donde el radio fue de 3.28 ± 0.83 cm.

**6.4.2. Prueba de antagonismo con quitosano de peso molecular medio QTM
(381.84 ± 11.29 kDa).**

La partícula encapsulada con *T. asperellum* y quitosano fue ubicada en el extremo del disco de *M. royeri* a la misma distancia del extremo opuesto de la caja.

Tabla 5: Prueba de Antagonismo (cultivos duales con *M. roreri*) con partícula de quitosano QTM (381.84 ± 11.29 kDa).

Concentración de QTM(%p/v)	Días de Cultivo			
	0	3	6	10
0.10%				
0.25%				
0.50%				

Disco de *M. roreri*
Micelio de *M. roreri*

Partícula de alginato de sodio con QTM y *T. asperellum* co-encapsulados.

Micelio de *T. asperellum* esporulado desde la partícula a los 3 días.

Micelio de *T. asperellum* esporulado sobre el micelio de *M. roreri*.

Partícula de alginato de sodio con QTM y *T. asperellum* co-encapsulados.

Se presenta la cinética de crecimiento de *T. asperellum* a través de la partícula con quitosano de peso molecular medio correspondiente a la tabla 5.

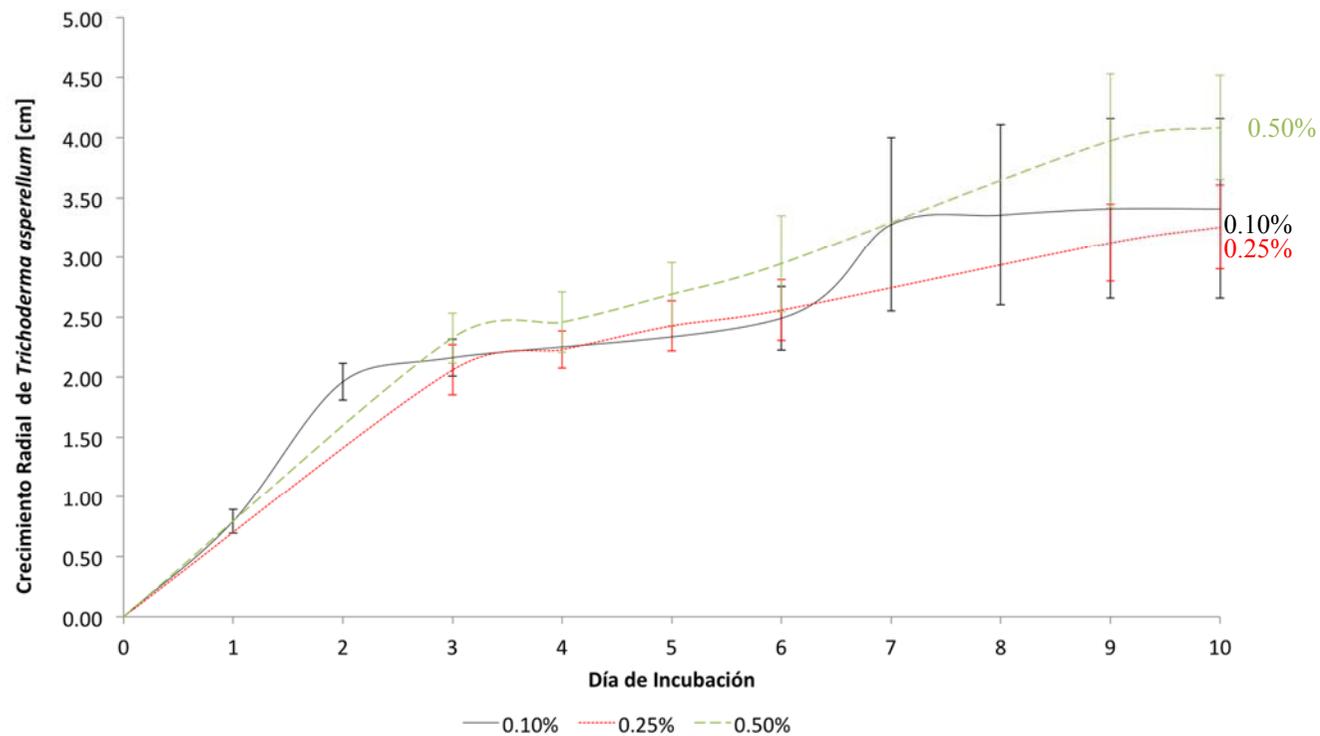


Figura 12: Cinética de crecimiento de *T. asperellum* encapsulado en partículas con QTM, en prueba de cultivo dual con *M. roreri*.

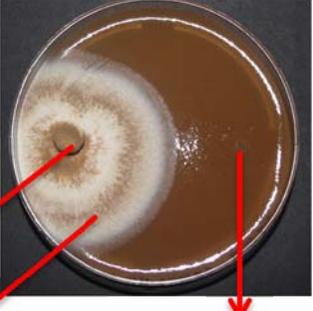
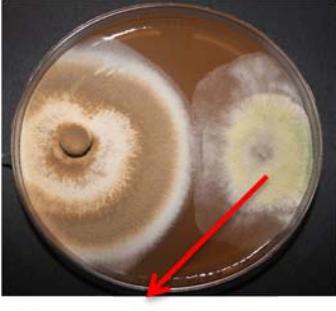
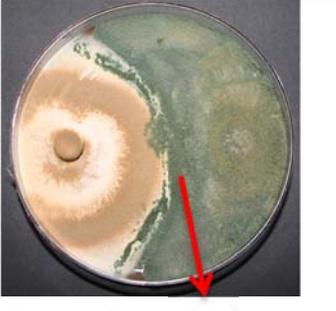
En la tabla 5 se observa que para el tercer día de la siembra, el micelio *T. asperellum* de igual forma que en el ensayo con QTL, entra ya en contacto con el micelio de *M. roreri*. En la figura 12 se puede ver que los valores de los radios del antagonista van desde 2.05 cm cuando QTM está encapsulado al 0.25% p/v hasta 2.32 cm cuando está al 0.50% p/v. A partir del contacto, el micelio de *M. roreri* dejó de crecer y para el sexto día se observa que *T. asperellum* coloniza toda la superficie de la caja Petri que no fue ocupada por el fitopatógeno.

Del sexto día hacia el décimo día de incubación, *T. asperellum* comenzó a sobrecrecer sobre el micelio estático de *M. roreri*. Pero a diferencia del ensayo con QTL, se observa en la figura 12 que el mayor crecimiento de *T. asperellum* se da cuando QTM es encapsulado con una concentración al 0.50 % p/v donde el radio del antagonista fue de 4.08 ± 0.43 cm en el décimo día. Y el crecimiento radial más bajo fue cuando la partícula encapsuló QTM al 0.25% p/v donde el radio fue de 3.25 ± 0.35 cm.

6.4.3. Prueba de antagonismo con quitosano de peso molecular alto QTH (812.69 ± 7.93 kDa).

La partícula encapsulada con *T. asperellum* y quitosano fue ubicada en el extremo del disco de *M. roreri* a la misma distancia del extremo opuesto de la caja.

Tabla 6: Prueba de Antagonismo (cultivos duales con *M. roreri*) con partícula de quitosano QTH (812.69 ± 7.93 kDa).

Concentración de QTH(%p/v)	Días de Cultivo			
	0	1	2	3
0.10%				
0.25%				
0.50%	 <p>Disco de <i>M. roreri</i></p> <p>Micelio de <i>M. roreri</i></p> <p>Partícula con QTH y <i>T. asperellum</i></p>	 <p>Micelio de <i>T. asperellum</i></p>		 <p><i>T. asperellum</i> esporulado sobre <i>M. roreri</i></p>

Se presenta la cinética de crecimiento de *T. asperellum* a través de la partícula con quitosano de alto peso molecular correspondiente a la tabla

6.

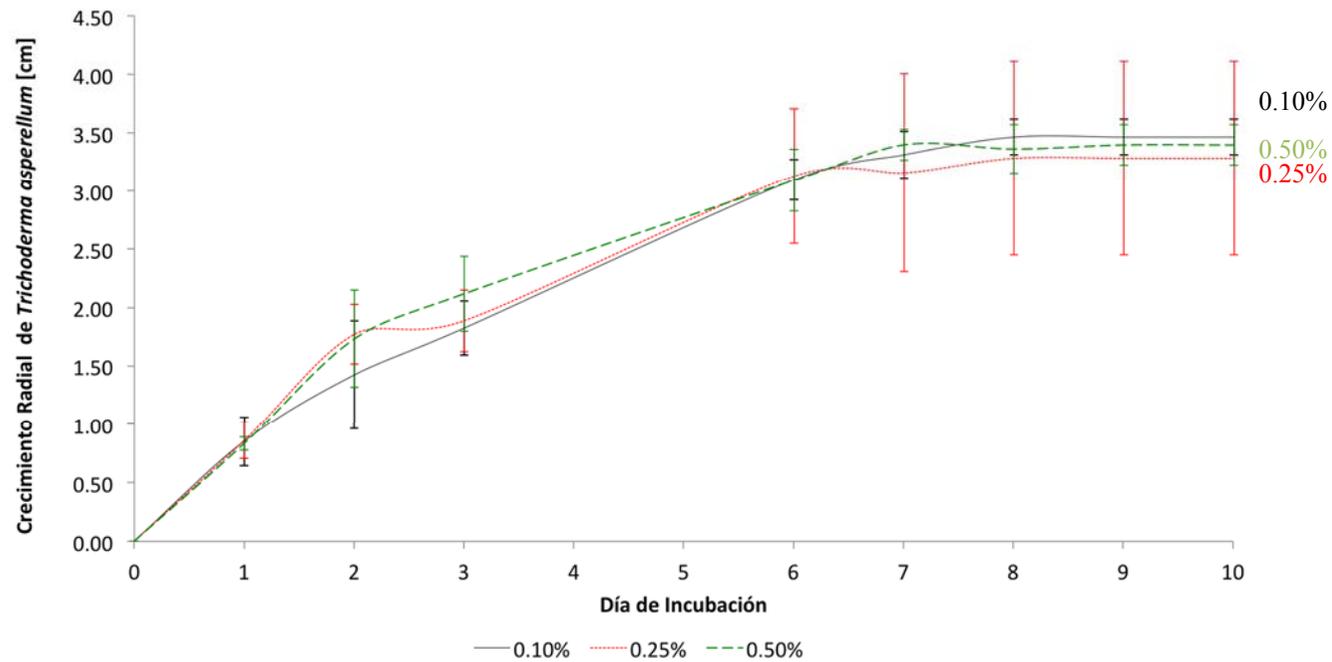


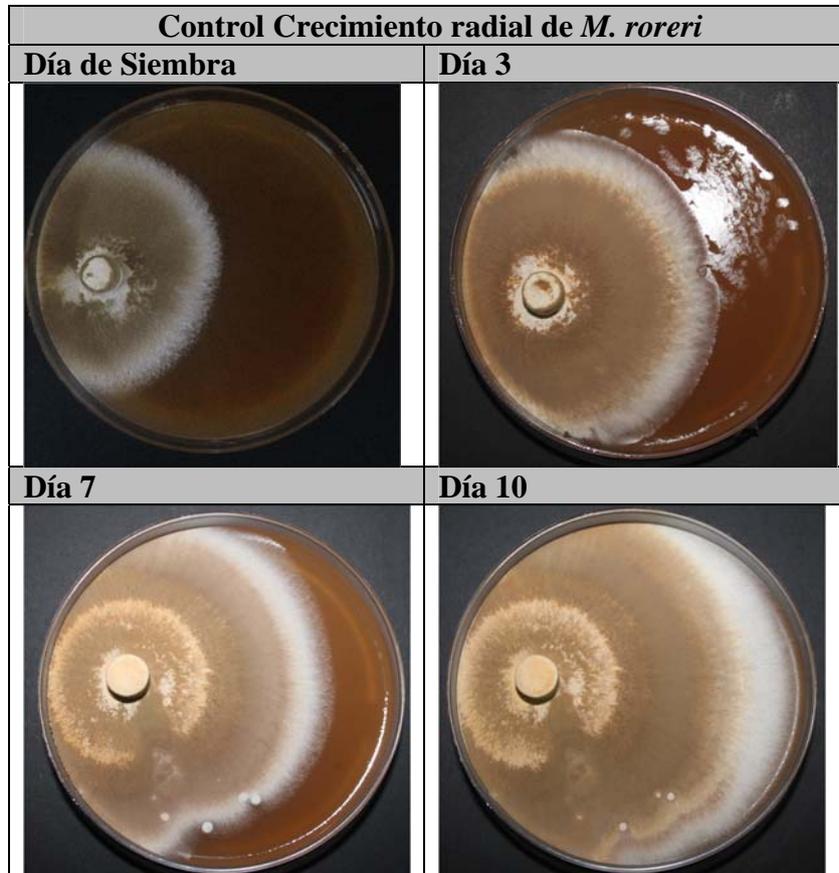
Figura 13: Cinética de crecimiento de *T. asperellum* encapsulado en partículas con QTH, en prueba de cultivo dual con *M. royeri*.

En la tabla 6 se observa que para el tercer día de la siembra, el micelio *T. asperellum*, de igual forma que los ensayos con QTL y QTM, entra ya en contacto con el micelio de *M. roreri*. De la figura 13, los valores de los radio del antagonista van desde 1.82 cm cuando QTH está encapsulado al 0.10% p/v hasta 2.11 cm cuando está al 0.50% p/v. A partir del contacto, el micelio de *M. roreri* dejó de crecer y para el sexto día se observa que *T. asperellum* coloniza toda la superficie de la caja Petri que no fue ocupada por el fitopatógeno.

Del sexto día hacia el décimo día de incubación, *T. asperellum* comenzó a esporular sobre el micelio estático de *M. roreri*. Sin embargo, para el décimo día de incubación no se observa divergencia de crecimiento de los radios del antagonista para ninguna de las 3 concentraciones de QTH. Cuando QTH está encapsulado en la partícula al 0.10% p/v permite a *T. asperellum* alcanzar un radio de 3.46 ± 0.15 cm, al 0.25% p/v se alcanzó un radio de 3.28 ± 0.83 cm, y al 0.50% p/v de 3.39 ± 0.17 cm.

A continuación se presentan los correspondientes controles a las pruebas de antagonismo. En primer lugar se muestra el control del crecimiento del fitopatógeno *M. royeri*.

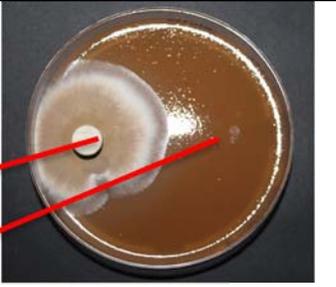
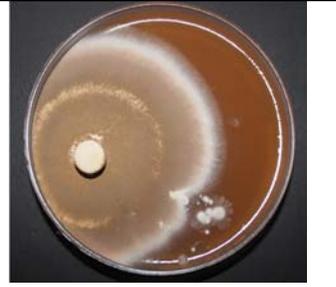
Tabla 7: Control de crecimiento radial de *M. royeri* a 30°C en V8.



En el control de crecimiento de *M. royeri*, se dejó esporular al fitopatógeno hasta el décimo tercer día antes del registro de datos. Se observó que para el día 7 el hongo logró ocupar $\frac{3}{4}$ de toda la caja Petri y colonizó la superficie completa de V8 para el décimo día de cultivo. A pesar de la lenta tasa de crecimiento del fitopatógeno, se ve que en los 10 días de observación, el hongo bajo cero condiciones de antagonismo crece en gran proporción.

A continuación se muestra el control de quitosano encapsulado en la partícula de alginato de sodio sin *T. asperellum*. Se encapsuló QTL, QTM y QTH al 0.25% p/v. El crecimiento de *M. royeri* se registro durante 10 días.

Tabla 8: Control de crecimiento de *M. royeri* con partículas únicamente con quitosano encapsulado.

Concentración de QT (%p/v)	Días de Cultivo			
	0	3	7	10
QTL al 0.25%				
QTM al 0.25%				
QTH al 0.25%	<p>Disco de <i>M. royeri</i></p> <p>Partícula solo con quitosano</p> 			

Se presenta la cinética de crecimiento de *M. royeri* bajo el control de quitosano encapsulado de acuerdo con la Tabla 8. Se incluye los datos de crecimiento de *M. royeri* correspondiente a la Tabla 7.

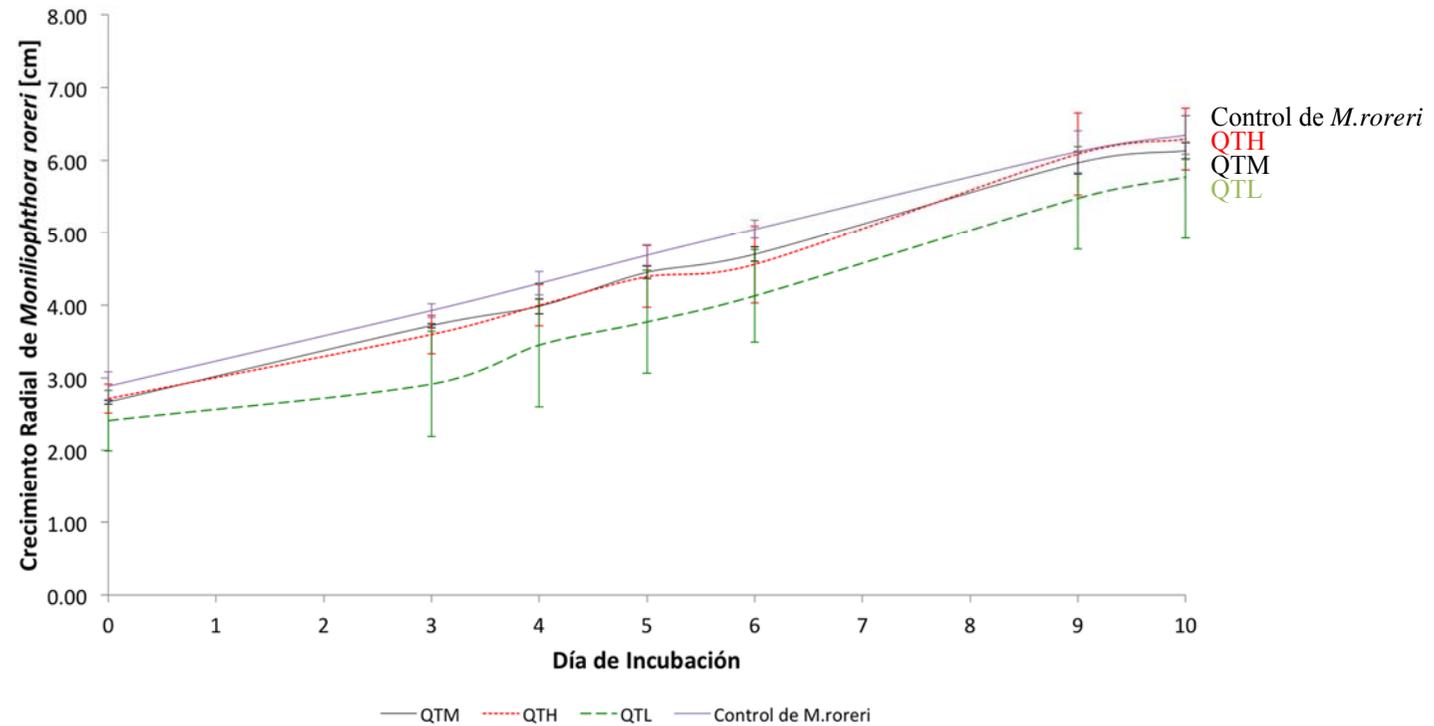
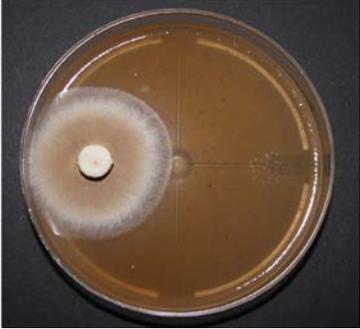
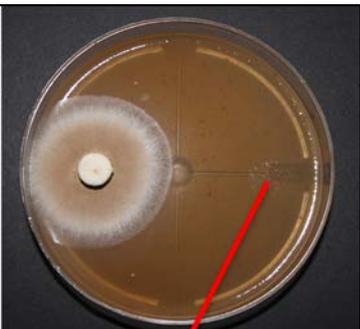


Figura 14: Crecimiento de *M. royeri* bajo el control de partícula únicamente con quitosano encapsulado al 0.25%.

De la figura 14, se observa que las partículas con QTL, QTM, y QTH no producen alteraciones en el crecimiento micelial de *M. royeri*. El radio micelial del fitopatógeno en el décimo día es de 6.29 ± 0.42 cm cuando la partícula tiene QTH. Lo cual es comparable con el radio micelial del control de la Tabla 7 con un radio de 6.34 ± 0.26 cm. Y de igual forma los valores de los radios con el control de QTL (5.76 ± 0.84) y QTM (6.13 ± 0.11) no divergen en mayor proporción si se observa en la figura anterior.

Se presenta también el control con alícuotas de quitosanos al 0.25%. La alícuota de quitosano se disolvió sobre el V8 en la misma posición que la partícula en las pruebas de cultivo dual.

Tabla 9: Control de crecimiento de *M. royeri* con quitosano encapsulado.

Concentración de QT(%p/v)	Días de Cultivo		
	0	3	10
QTL al 0.25%			
QTM al 0.25%			
QTH al 0.25%			

Alicuota de 30 uL de quitosano.

Se presenta la cinética de crecimiento de *M. royeri* bajo el control de quitosano correspondiente a la tabla 9.

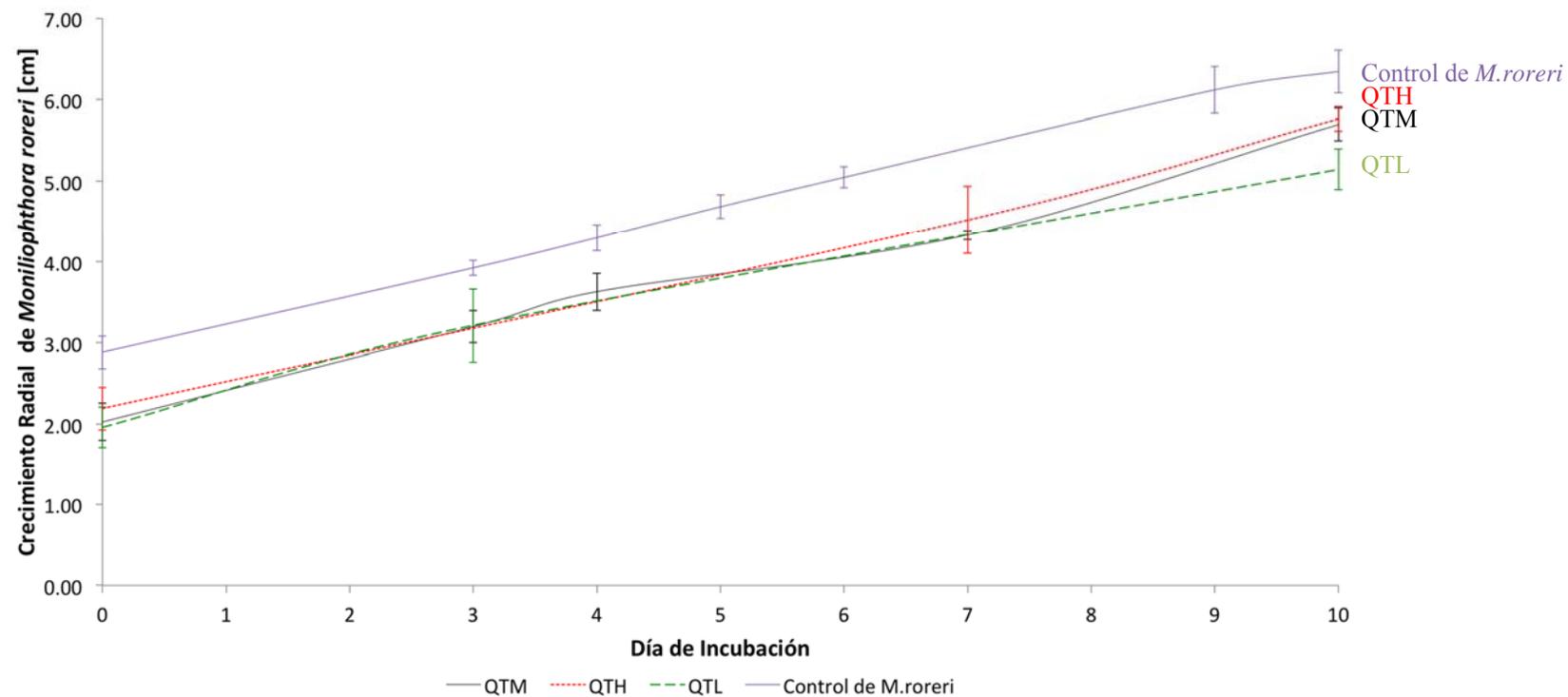


Figura 15: Cinética de crecimiento de *M. royeri* en el control con quitosano al 0.25%

De la figura 15, se observa que las alícuotas con QTL, QTM, y QTH no producen tampoco alteraciones en el crecimiento micelial de *M. roreri*. El radio micelial del fitopatógeno en el décimo día es de 5.76 ± 0.15 cm cuando la partícula tiene QTH. Valor que no diverge demasiado con el radio micelial del control de la Tabla 7 con un radio de 6.34 ± 0.26 cm. Y de igual forma los valores de los radios con el control de QTL (5.15 ± 0.25 cm) y QTM (5.69 ± 0.20 cm) no divergen en mayor proporción si se observa en la figura anterior.

En la Tabla 10 se presenta el control de *T. asperellum* sin encapsular y *T. asperellum* encapsulado en partículas de alginato de sodio. Para el control de *T. asperellum* sin encapsular, se puso la alícuota de 30 uL en el lado opuesto al disco de *M. roreri* a 1 cm del borde la caja Petri.

Tabla 10: Control de *T. asperellum* sin encapsular y *T. asperellum* encapsulado.

Ensayo	<i>T. asperellum</i> sin encapsular	<i>Trichoderma</i> encapsulado
Día de 0 siembra		
Día 3 de incubación		
Día 6 de incubación		
Día 10 de incubación		

Lugar donde se sembró la alícuota de 30 uL de *T. asperellum*

Partícula de alginato de sodio que encapsula solo *T. asperellum*

Se presenta la cinética de *T. asperellum* correspondientes a los controles de la tabla 10.

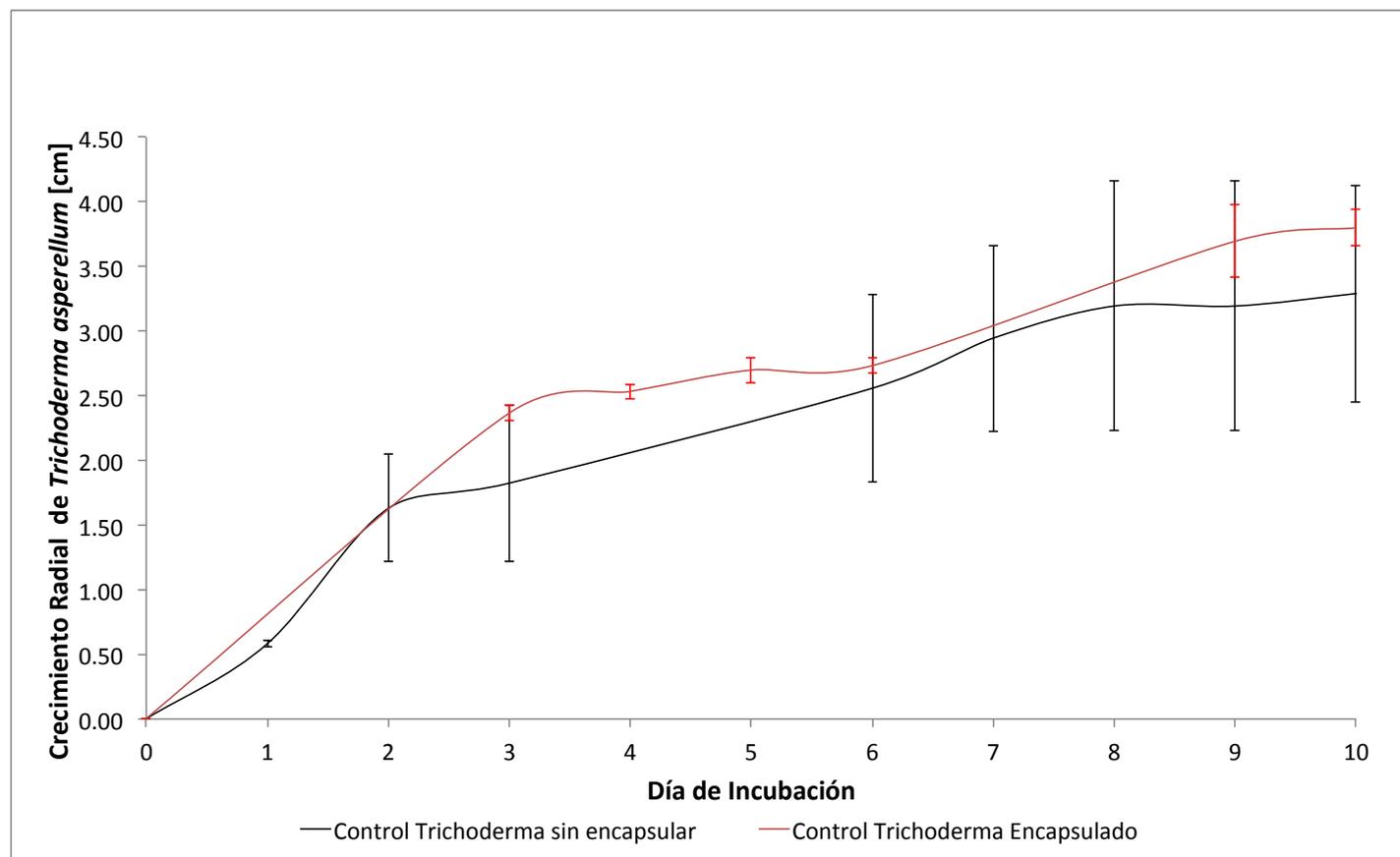


Figura 16: Cinética de crecimiento de *T. asperellum sin encapsular* y *T.asperellum* encapsulado.

En la figura 16, se observa radios miceliales de *T. asperellum* comparables a los resultados de ensayos antagonistas con las partículas biopoliméricas de las tablas 4,5, y 6. En ambos casos para el tercer día, se vuelve a visualizar el contacto entre micelios y para el décimo día se visualiza el micoparasitismo de *T. asperellum* sobre *M. royeri*. Cuantitativamente, el radio de *T. asperellum* para el décimo día en el control de *Trichoderma* sin encapsular es de 3.28 ± 0.83 cm, y el radio obtenido para el control de *T. asperellum* encapsulado es de 3.79 ± 0.14 cm. Estos dos valores se comparan con lo discutido para los ensayos de cultivo dual con QTL, QTM, y QTH.

Pero para comparar de mejor forma ambos controles con los resultados obtenidos en las tablas 4, 5, y 6. Se realizó gráficas comparativas de la cinética de *T. asperellum* en función de la concentración encapsulada en la partícula a continuación.

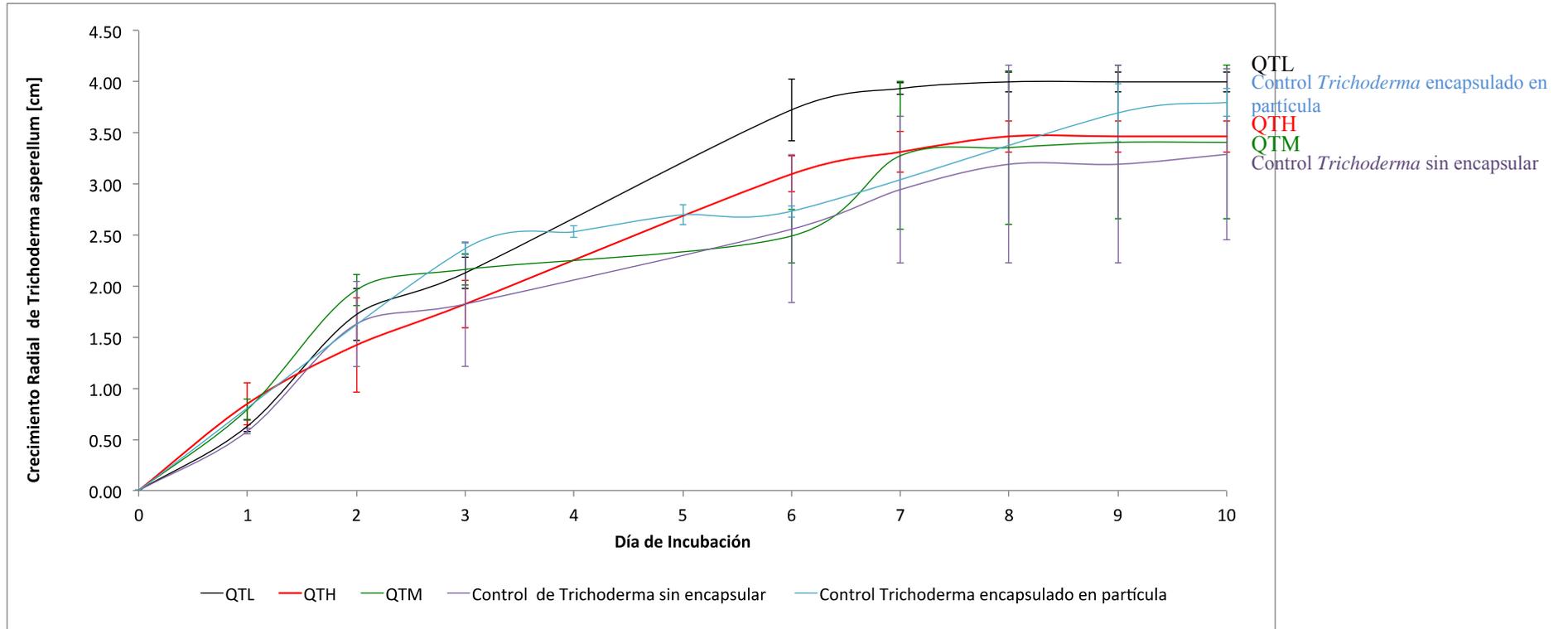


Figura 17: Comparación de cinéticas de crecimiento de *T. asperellum* en pruebas duales con partículas biopoliméricas con QTL, QTM y QTH al 0.10%.

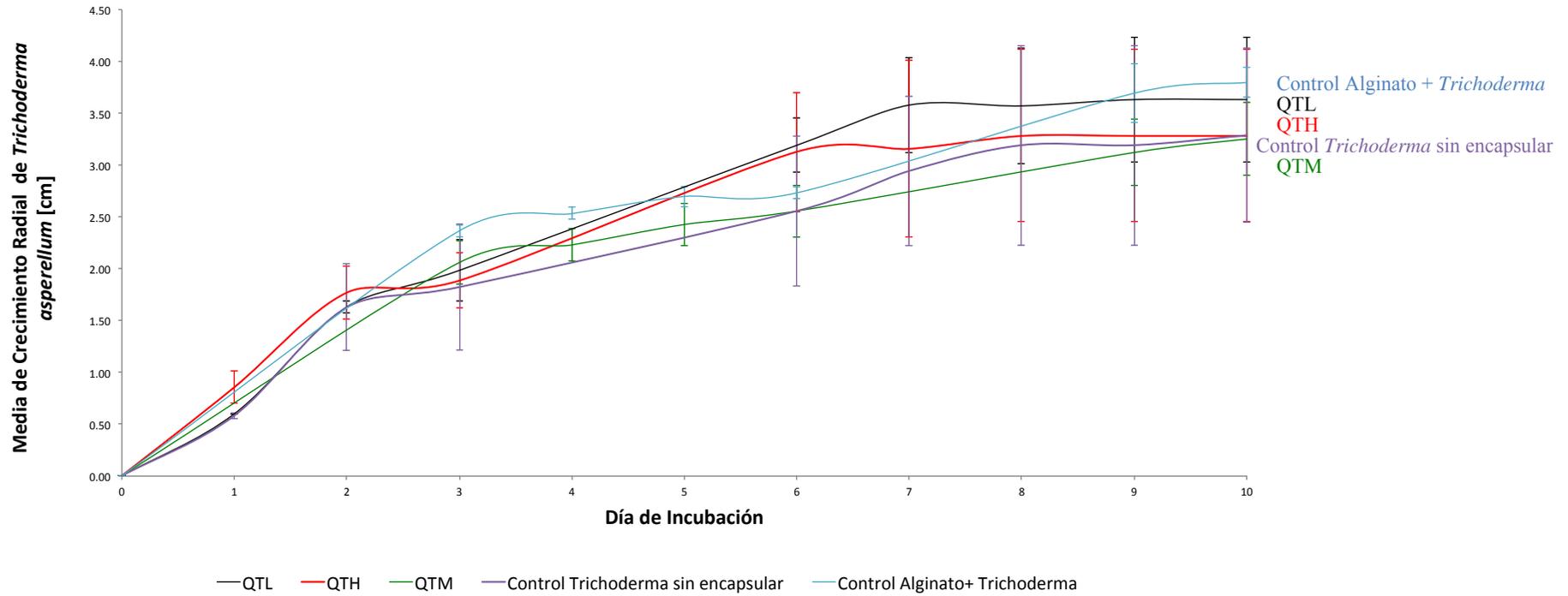


Figura 18: Comparación de cinéticas de crecimiento de *T. asperellum* en pruebas duales con partículas biopoliméricas con QTL, QTM y QTH al 0.25%.

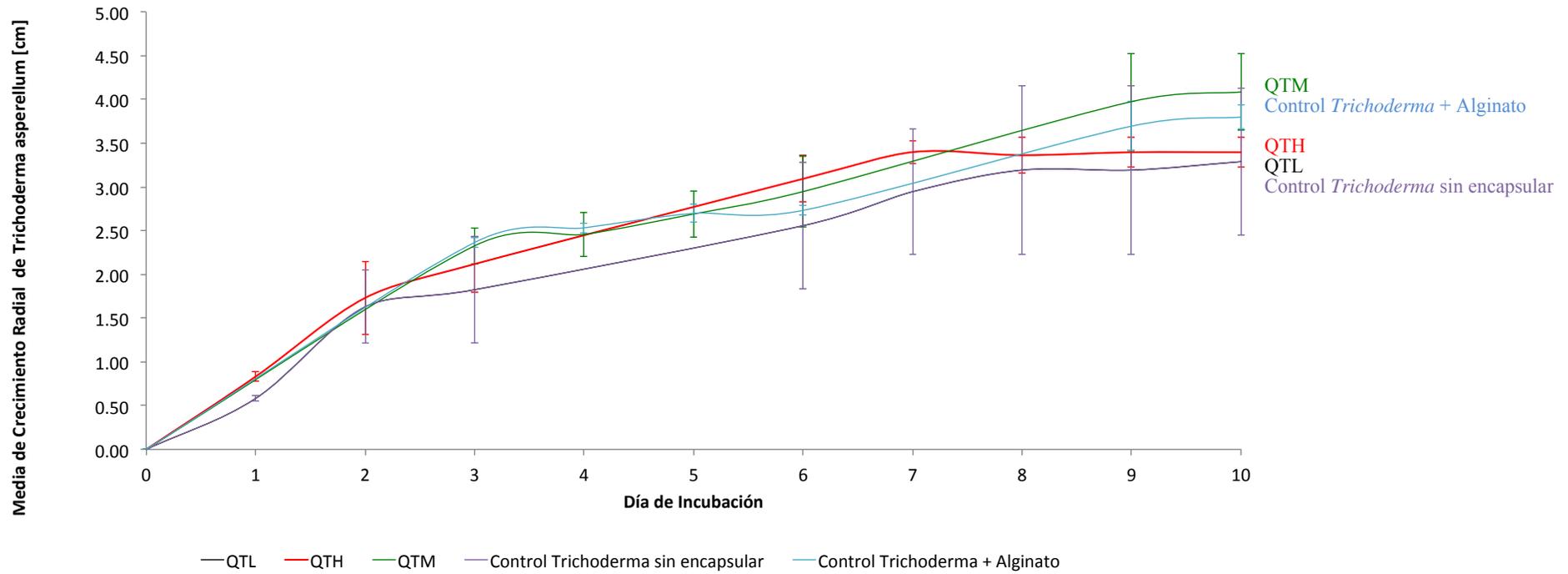


Figura 19: Comparación de cinéticas de crecimiento de *T. asperellum* en pruebas duales con partículas biopoliméricas con con QTL, QTM y QTH al 0.50%.

En las figuras 17, 18 y 19 el resultado más destacable de mencionar es la curva del control de *T. asperellum* sin encapsular. Esta curva cinética cae por debajo de todos los ensayos de antagonismo que se realizó. A pesar que no se distancia mucho de los valores de radio de *T. asperellum* de los demás ensayos con las partículas con los quitosanos encapsulados, éste resultado evidencia cierta inducción de crecimiento del hongo antagonista al ser encapsulado. A este punto según la escala de Bell, los ensayos antagonistas de las tablas 4, 5, 6 y 10 se caracterizan como categoría II donde el hongo antagonista cubre 2/3 de la caja Petri.

Poca es la literatura de la encapsulación de *Trichoderma spp.* y quitosano co-encapsulados e incluso del efecto del peso molecular sobre el género *Trichoderma*, pero si se ha reportado la combinación de ambos. *T. harzianum* y quitosano con concentración (0.5 o 1 g/L) fueron testeados en una solución foliar contra *Fusarium* y el resultado de la combinación fue en la inducción de enzimas quitinasas que inhibieron mayormente *Fusarium* (El-Mohamedy & Farid, 2014). A pesar que no se evaluaron el tipo de enzimas producidas por *T. asperellum* durante los ensayos, el crecimiento de la cepa sobre el fitopatógeno también corrobora la relación positiva con quitosano a bajas concentraciones. De los resultados mostrados anteriormente, se reporta en general que quitosano no inhibe la esporulación de *T. asperellum*, e incluso a una concentración de 0.50% p/v de quitosano de peso molecular medio el crecimiento de *Trichoderma* es mejor, y estudios con un rango más de amplio de concentraciones debe ser testado en la combinación microorganismo-biopolímero.

En cuanto al material de encapsulación, se observa cualitativamente de las tablas 4, 5 y 6 que el aspecto verdoso alrededor del área de sembrado de la partícula es más abundante en comparación con los controles de la tabla 10. Lo cual evidencia que la matriz esférica promueve viabilidad a las células de *T. asperellum*. Pues Adzmi et al.(2012) demostraron que *T. harzianum* microencapsulado en alginato era capaz, incluso, de mantener la viabilidad de las células del

microorganismo hasta temperaturas de 5-2 °C. Lo que hace que, a partir del presente estudio también se pueda considerar la efectividad del recubrimiento de alginato de sodio bajo condiciones de campo.

Uno de los estudios más significantes y relacionados con el presente estudio fue el realizado por Maldonado (2016) donde evaluó el crecimiento de *T. harzianum* y *T. asperellum* encapsulados en partículas de alginato con quitosano co-encapsulado, a concentraciones de 0.25, 0.50, 0.75% y 1% contra *M. pernicioso* y *M. roreri*. En ensayos de antagonismo encontró un PIC de 50% contra *M. pernicioso*. Este resultado es bastante cercano a la media de PIC% obtenidos para los ensayos en el presente estudio como se mencionó de 30-40%. Sin embargo, Maldonado (2016), reportó también que *T. harzianum* fue un mejor biocontrol que *T. asperellum* frente a *M. roreri*. Por lo cual, los presentes resultados encaminan a mejorar y seguir estableciendo pruebas de antagonismo con *Trichoderma* encapsulada en la partícula de alginato de sodio con otras cepas.

Por lo que en general, se ha comprobado que la matriz de encapsulación, la partícula, promueve el crecimiento del microorganismo antagonista en igual magnitud que la cepa sin encapsular. Por lo cual ya se tiene una biopolímero funcional que puede ser ya probado en campo para ver su actividad en las plantaciones de cacao en el Ecuador, como una alternativa a reemplazar el uso excesivo de fungicidas y controlar la moniliasis naturalmente.

En cuanto a la estadística, de la figura 26 en las sección de anexos, correspondiente al Anova donde la variable dependiente es el crecimiento de *T. asperellum* en los ensayos de cultivos dual, se encontró que hay una significancia estadística del crecimiento del antagonista únicamente por del tiempo. Lo cual es razonable pues a mayor tiempo de incubación el hongo crece más. Por otro lado, se ve que el crecimiento del hongo antagonista no se debe ni al tipo de quitosano usado por el peso molecular ni tampoco a las concentraciones usadas donde la

significancia de estas es mayor a 0.05. Pero sí existe significancia estadística entre la correlación del grupo de peso y concentraciones ($p = 0.001$). Es decir, en cierto grado el crecimiento del antagonista si se ve afectado única y especialmente cuando se da una relación del peso molecular de los quitosanos y concentraciones.

En cuanto a las pruebas post Hoc de Tukey, figuras 27, 28, y 29, las medias de los subconjuntos de peso molecular y concentraciones son todos iguales. Pero las medias del subconjunto del tiempo si son diferentes excepto para los días 9 y 10 de incubación.

En el Anova de la figura 30 donde la variable dependiente es el crecimiento de *M. roreri*, tuvo significancia estadística el tiempo, el peso molecular del quitosano, y la concentración de quitosano usada. Es decir, cada uno de estos factores separados si afectan al crecimiento del hongo fitopatógeno. Pero, al contrario de lo que se vio en el Anova de *T. asperellum*, al relacionar concentraciones, pesos moleculares y tiempo estos no tienen significancia.

En cuanto a las pruebas post Hoc de Tukey, en la figura 31, para el subconjunto de concentraciones, las medias cuando el quitosano esta al 0.50% son diferentes de las de 0.10% y 0.25% debido a los resultados que se obtuvieron en la tabla 10 cuando el quitosano de peso molecular medio hizo que *T. asperellum* crezca más haciendo que *M. roreri* detenga su crecimiento más rápido. Lo mismo ocurre en la figura 32 donde las medias del subconjunto del peso molecular es diferente en el quitosano de alto peso molecular. Finalmente, en cuanto a las pruebas post Hoc de Tukey del tiempo del crecimiento de *M. roreri*, únicamente en el día 0 de siembra son diferentes debido a que fue el inicio de los cultivos y los radios de *M. roreri* variaban en milímetros.

A continuación, se presenta los porcentajes de inhibición de crecimiento (PIC) obtenidos para las diferentes partículas biopoliméricas con los diferentes quitosanos en el sexto día.

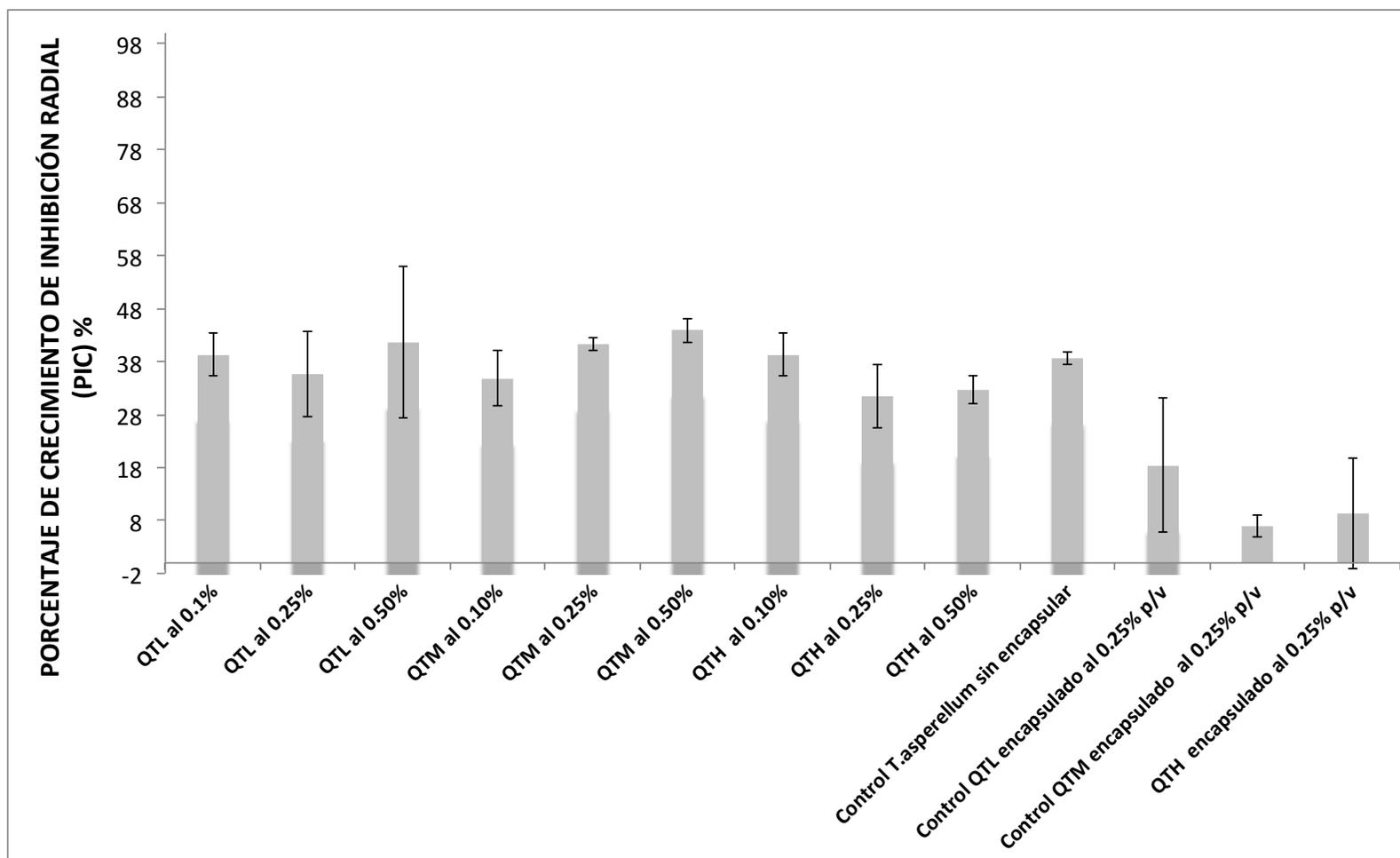


Figura 20: PIC% de *M. roveri* por partículas biopoliméricas de *T. asperellum* con quitosano encapsulado y controles en el sexto día.

Si se observa en la figura 20, los porcentajes de PIC% de los 9 ensayos de cultivos dual, entre 30-40%, se comparan al control de *T. asperellum* sin encapsular (PIC = 38.62 ± 1.13 %). Todo esto implica que la partícula como nuevo biocontrol es capaz de permitir el crecimiento de *T. asperellum* en características similares al control de *T. asperellum* frente a *M. roreri* sin encapsular, ver Tabla 10. Pues en general, el nuevo biocontrol está encaminado a no producir efectos de inhibición en *T. asperellum* por la presencia de quitosano y a la vez reproducir en igual o mayor magnitud el crecimiento del mismo, pues se espera que la matriz de alginato de sodio de mayor actividad de antagonismo cuando se pruebe sus efectos en campo. Se espera también que la partícula prolonge el crecimiento de *Trichoderma spp.* sobre los suelos de cultivos de cacao en el Ecuador, de modo que *M. roreri* no tenga la posibilidad de colonizar las plantas y evitar la putrefacción de las mazorcas.

Referente a la parte estadística, para el post hoc del PIC% (figura 41) es notorio mencionar que la inhibición más baja de la partícula con quitosano de alto peso molecular al 0.25% posee media iguales al control de *T. asperellum* sin encapsular, lo que significa que posee una inhibición igual corroborando lo que se analizó en la discusión del antagonismo donde se expresó que la partícula como nuevo control biológico si es capaz de producir efectos iguales a la *Trichoderma* sin encapsular.

6.5.Micoparasitismo

A continuación se presentan dos resultados cualitativos y representativos de las pruebas de micoparasitismo de *T. asperellum* frente *M. roreri*. Esto debido a que bajo ninguna de las condiciones experimentales incluyendo los controles se observó crecimiento de *T. asperellum* desde la partícula biopolimérica. A pesar de que, se realizó los mismos ensayos y controles que en las pruebas de antagonismo en ninguno de ellos se obtuvieron resultados positivos. Las partículas biopoliméricas se ubicaron alrededor del disco de *M. roreri* a 1 cm de los bordes de las cajas.

Tabla 11: Prueba de micoparasitismo con partícula de *T. asperellum* y QTL co-encapsulados.

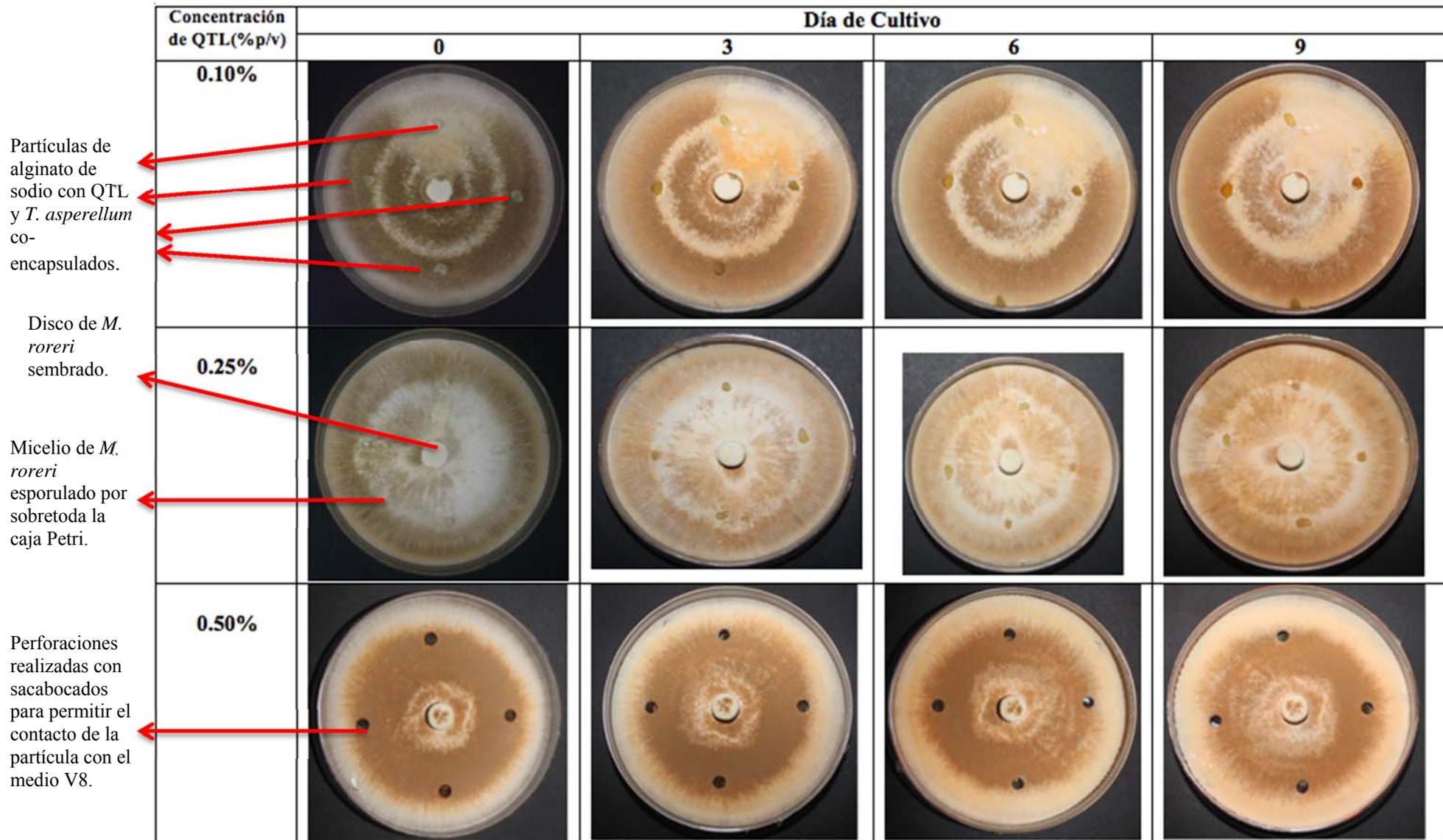
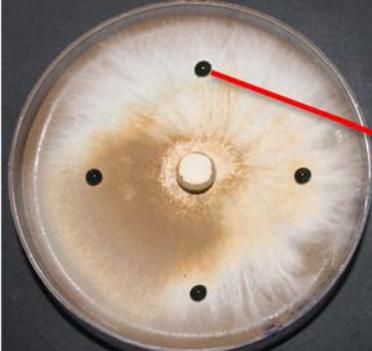
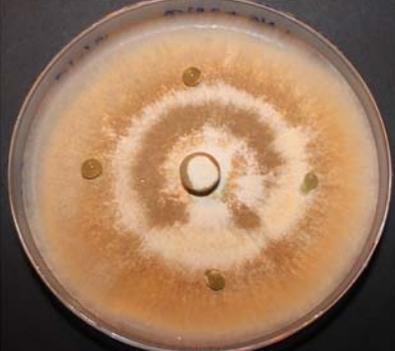
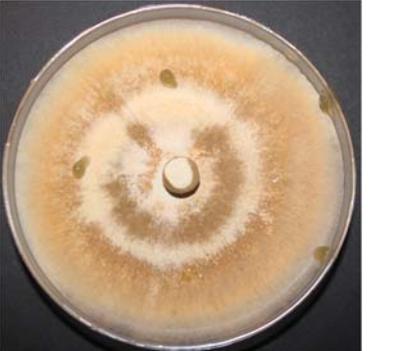


Tabla 12: Control de *T. asperellum* sin encapsular y *T. asperellum* encapsulado en micoparasitismo.

Ensayo	<i>Trichoderma</i> sin encapsular		<i>Trichoderma</i> encapsulado
Día de siembra		<p data-bbox="799 495 954 600">Alícuota de 30 uL de <i>T. asperellum</i></p>	
Día 3 de incubación		<p data-bbox="823 853 991 1070">Partícula de alginato de sodio que encapsula solamente <i>T. asperellum</i></p>	
Día 6 de incubación			
Día 10 de incubación			

Como se observa en la tabla 11 y 12 no se evidencia crecimiento micelial de *T. asperellum*.

Para los primeros ensayos con partículas con QTL al 0.10% p/v se decidió ubicar las partículas encima del micelio de *M. roreri*. Al no observar esporulación en el décimo día de incubación, se optó por realizar huecos con sacabocados de 1 mm sobre *M. roreri* con el objetivo de ubicar la partícula en el interior de este y lograr el contacto con el medio V8. Sin embargo, los resultados fueron los mismos y el hongo antagonista no esporuló desde la partícula.

Tanto los ensayos con los 3 quitosanos de diferente peso molecular y controles no produjeron cambio alguno sobre el micelio desarrollado del fitopatógeno. Si bien en condiciones de micoparasitismo el control biológico no resultó eficiente, es necesario reportar entonces que una vez crecido el fitopatógeno, la cepa de *T. asperellum* no es capaz de atacar a *M. roreri*. Se buscaría entonces probar el ensayo de micoparasitismo con un tipo de cepa más agresiva.

Los resultados obtenidos para los ensayos con partícula con QTH se muestran en el anexo 10.10.

7. CONCLUSIONES

Se elaboró un control biológico contra *Moniliophthora roreri*, formando una partícula biopolimérica de alginato de sodio que encapsula *T. asperellum* y quitosano. De las pruebas de cultivo dual realizadas con el objetivo de evaluar las actividades antagónicas de *T. asperellum* frente a *M. roreri*, se encontró que utilizando 3 quitosanos de diferente peso molecular y a 3 diferentes concentraciones:

- Según la escala de Bell el antagonismo es de clase II en todos los casos.
- El porcentaje de inhibición de crecimiento radial PIC, contra *M. roreri* en todos los ensayos fue comparable con el control de *T. asperellum* sin encapsular, alcanzando porcentajes de 30 a 40%, con lo que se reporta que el encapsulamiento es capaz de permitir el crecimiento del hongo antagonista normalmente e inhibir en igual magnitud al *M. roreri*.
- Se encontró que la partícula con quitosano de peso molecular medio al 0.50% p/v promovió el mayor crecimiento de *T. asperellum*, cuyo radio micelial esporulado sobre el micelio de *M. Roreri* al décimo día de incubación fue de 4.08 ± 0.43 cm. Las partículas con quitosano de bajo peso molecular al 0.10% p/v también permitieron obtener un radio micelial comparable de *T. asperellum* de 3.99 ± 0.10 cm. Sin embargo, la partícula con quitosano de alto peso molecular no presentó diferencias grandes del valor del radio micelial para ninguna de las tres concentraciones, donde el radio mayor fue 3.46 ± 0.15 cm al 0.10% p/v y el menor fue de 3.28 ± 0.83 cm al 0.50% p/v en el décimo día de incubación.
- En pruebas de micoparasitismo, la partícula no fue capaz de promover el crecimiento de *T. asperellum* para ninguno de los 3 pesos moleculares de quitosanos usados, concluyendo que la cepa co-encapsulada no presenta actividad micoparasitaria una vez que el hongo fitopatógeno ocupa toda la placa Petri.
- Los análisis estadísticos mostraron que el crecimiento de *T. asperellum* se ve afectado únicamente por el tiempo de incubación. En cambio, el crecimiento de *M. roreri* es afectado por el peso molecular del quitosano, la concentración usada y el tiempo de incubación.

8. RECOMENDACIONES

- Debido a que *T. asperellum* no es capaz de esporular desde la partícula en condiciones de micoparasitismo, se recomienda encapsular en la partícula otro tipo de cepa más agresiva como *T. harzianum*.
- Analizar el efecto de concentraciones de quitosano por sobre el 0.50% p/v y por debajo de 0.10% con el quitosano de peso molecular medio.
- Evaluar la funcionalidad de la partícula en invernadero, y posteriormente, en el caso de observar efectos significativos, llevar a cabo estudios en campo, en parcelas experimentales. Para esto, sin embargo, será importante desarrollar un sistema de producción en masa del producto encapsulado, a través de la producción de partículas que puedan ser fácilmente aplicables.
- Considerar la coencapsulación del *Trichoderma* y el quitosano con otras moléculas bioactivas que tengan un rol importante en el sistema de defensa de la planta de cacao, tal es el caso de los polifenoles.

9. REFERENCIAS

Agrios,G.(1991). Fitopatología. México: Editorial Limusa

Al-Najada,A., y Gherbawy,Y.(2015). Molecular Identification of Spoilage Fungi Isolated from Fruit and Vegetables and Their Control with Chitosan. *Food Technology*, 19(2), 166-184.

Albuquerque, C., Bucarey ,S.A., Neira-Carrillo,A., Urzúa, B., Hermosilla,G., y Tapia,C-V.(2010).Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida spp.* *Medical Mycology*, 48, 1018-1023.

Albuquerque,P.S.B., Bastos,C.N., Luz,E.D.M.N., y Silva,S.D.V.M.(2005). Doenças do cacaueiro (Theobromacacao). Em: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende,J.A.M.; Bergamin Filho, A; Camargo, L.E.A. (Eds.).*Manual de Fitopatología*,2(4), 151-163.

Alexandrova,M., Bazzi,C., y Lameri,P.(2003). *Bacillus Subtillis* strain BS-F3: colonization of pear organs and its action as a biocontrol agent. *Acta Horticulturae*, 590, .291-291.

Anecacao.(2017). Revista Especializada en Cacao. 12va.Edición.

Arévalo, K.(2016). Obtención de un material compuesto de quitosano con nanopartículas de hematita para la remoción de Zinc. (Tesis de Pregrado). Escuela Politécnica Nacional.Quito.

- Atanasova, L., Druzhinina, I.S., y Jaklitsch, W.M.(2013a). Two hundred *Trichoderma* species recognized based on molecular phylogeny. *In Trichoderma: Biology and Applications.*(Eds.), Mukherjee, P.K., Singh, U.S., Horwitz B.A., Schmoll, M., Mukherjee, M., CABI of Nosworthy Way. Wallingford, Oxon.
- Azarpira, M.R., Shahcheragui, G.H., Ayatollahi, M., y Geramizadeh, B.(2015). Tissue engineering strategy using mesenchymal stem cell-based chitosan scaffolds in growth plate surgery: a preliminary study in rabbits. *Orthopaedics & traumatology : Surgery & Research.* 101(5), 601-605.
- Azuma, K., Izumi, R., Osaki, T., Ifuku, S., Morimoto, M., Saimoto, H., Minami, S., y Okamoto, Y.(2015). Chitin, chitosan and its derivatives for wound healing: old and new materials, *J. Funct. Biomater,* 6, 104-142.
- Barnett, H-L.(1964). Mycoparasitism. *Mycology,* 56, 1-19.
- Benítez, T., Rincón, A., Limón, M., y Codón, A.(2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology* 7, 249-260.
- Benucci, I., Liburdi, K., Cacciotti, I., Lombardelli, C., Zappino, M., Nanni, F., y Esti, M.(2017). Chitosan/clay nanocomposite films as supports for enzyme immobilization: An innovative green approach for winemaking applications. *Food Hydrocolloids,* 74, 124-131.

Bodo, B., Rebuffat,S., El Hajji,M., Davoust,D.(2010). Structure of trichoarzinines A IIIc, an antifungal peptide from *Trichoderma Harzianum*. *Journal of the American Chemical Society* 107, 6011-6017.

Celoromics.(s/f). Conteo Celular con Hematocitómetro. DOI:
<http://www.celoromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>

Cevallos,J.(2005). Relaciones de Género en el ciclo productivo de Cacao:¿Hacia un desarrollo sostenible?. Tesis de Grado. Flacso :Quito.

Chittenden,C., y Singh,T.(2009). In vitro evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of *Sapstain* fungi. *Biological Control*, 50, 262-266.

Ciferri, R., y Parodi,E. (1933). Descrizione del fungo checausa la "Moniliasi" del cacao. *Phytopathol*, 6, 539-542.

Claydon N.m Allan M., Hanson J. R., y Avent A. G. (1987). Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*.*Transactions of the British Mycological Society Transactions of the British Mycoiogical Society*,88, 503-513.

Connick, W.J. (1988). Formulation of Living Biological Control Agents with Alginate, in: 517 Pesticide Formulations, ACS Symposium Series. *American Chemical Society*, 518, 241–250.

- De Alvarenga, E.S.(2011). Characterization and Properties of Chitosan. Biotechnology of Biopolymers, Prof. Magdy Elnashar (Ed.), ISBN: 978-953-307-179-4, Intech: Brazil.
- De Jaeger, N., De la Providencia, I.E., Rouhier,H., y Declerck, S.(2011). Co-entrapment of *Trichoderma harzianum* y *Glomus sp.* Within alginate beads : impact on the arbuscular mycorrhizal fungus life cycle. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 125-135.
- Dennis C. y Webster J. (1971b). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57, 41-48
- Dimzon, I., y Knepper, T.(2015). Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. *International journal of Biological Macromolecules*, 12, 930-945.
- Dong-Wan, C., Hochoel,S., Bokseong, K., Schwartz,F., y Byong-Hun.(2015). Reduction of Nitrate by Fe(0)/ Magnetite Nanoparticles Entrapped in Ca-alginates beads. *Water air Soil Pollut*, 206, 1-10.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komon, M., Bissett, J., Szakacs,G., y Kubicek,C.P.(2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol* 42, 813-828.

- El Ghaouth, A., Arui, J., Grenier, J., Asselin, A. (1991). Antifungal Activity on two Postharvest pathogens of Strawberry Fruit. *Phytopatology*, 82(4), 398-402
- El Hajji, M., Rebuffat, S.; Lecommandeur, D.; Bodo, B. (1987). Isolation and sequence determination of trichotharzin A antifungal peptides from *Trichoderma Harzianum*. *International of Protein and Peptide Research*, 29, 207-215.
- El-Mohamedy, R.S.R., y Abdel-Kareem, F. (2014). Chitosan and *Trichoderma Harzianum* as Fungicide Alternatives for Controlling Fusarium Crown and Root Rot of Tomato. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 9, 31-43.
- Ellis, R.-J., Timms-Wilson, T.-M., Beringer, J.-E., Rhodes, D., Renwick, A., Stevenson, L., y Bailey, M.-J. (1999). Ecological Basis for biocontrol of damping off disease by *Pseudomonas fluorescens* 54/96. *Microbiol*, 87, 454-463.
- Endres, H.-J., y Siebert-Raths, A. (2009). Technische Biopolymere: Rahmenbedingungen, 546 Marktsituation, Herstellung, Aufbau und Eigenschaften. Hanser Verlag, München.
- Escobar, D., Ossa, C., Quintana, M., y Ospina, A. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientzia et Technica* 18, 260-266
- Evans, H.C., Holmes, K.A., y Reid, A.P. (2003). Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology*, 52, 476-485.

- Evans,H.C., Stalpers,J.A., y Samson, R.A.(1978). On the taxonomy of *Monilia Roreri*, an important pathogen of *Theobroma Cacao* in South America.*Can.J.Bot*, 56, 2528-2532.
- Fariz,A., Meon,S., Mohamed, H., y Nor,A.(2008). Preparation, characterizatiom and viability of encapsulated *Trichoderma Harzianum* UPM40 in alginate-montomorillonite clay. *Journal of Microencapsulation*,29(3), 205-210.
- FEDECACAO. Federación Nacional de Cacaoteros.(2004). Reconocimient y control de la moniliasis del Cacao. Plegable 3. Colombia. 4.
- Ferrera,R., y Alarcón,A.(2007). Microbiología Agrícola. Hongos,bacterias, micro y microfauna, control biológico y planta-microorganismo. México: Editorial Trillas.
- FHI.Federación Hondureña de Investigación Agrícola.(2003). Identificación y Control de la Monilia del Cacao. Cortés, Honduras. 24.
- FHIA(Fundación Hondureña de Investigación Agrícola). (2003). Identificación y control de la moniliasis de Cacao. Cortés, Honduras.24.
- Fotoohiyan,Z., Rezaee, S., Bonjar, G.H.S., Mohammadi, A.H., y Moradi, M.(2017). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* in controlling wilt disease of pistachio caused by *Veticillium dahliae*. *Journal of Plant protection Research*, 57,(2), 185-193.

- Galarza,L., Akagi, Y., Takao,K., Kim,C-S., Maekawa, N., Itai,A., Peralta, E., Santos,E., y Kodama,M.(2015). Characterization of trichoderma species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan.*Journal of General Plant Pathology*, 81, 201-210.
- Geraldine, A., Cardoso,F., Carvalho, D., Barbosa,E., Rodrigues,A., Brandao, R., Ulhoa, J., y Murillo,L.(2013). Cell wall degrading enzymes and parasitism of *Sclerotinia* are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological control*, 67(3), 308-316.
- Ghisalberti E. L., y Sivasithamparam K. (1990) Secondary metabolites produced by biological control agents. Proceedings of The Fourth International Mycological Congress. Regensburg. Fed. Rep. Germany, 230.
- Green, B.K., 1955. Pressure sensitive record material. US Patent 2,712,507.
- Gritsch, L., Lovell, C., Wolfgang, G., y Boccaccini,A.(2018). Fabrication and characterization of copper (II)- chitosan complexes as antibiotic- free antibacterial biomaterial. *Carbohydrate Polymers*, 179, 370- 378.
- Guigón-López,C., Vargas-Albores, F., Guerrero-Prieto, V., Ruocco, M., y Lorito,M.(2015). Changes in *Trichoderma asperellum* enzyme expression during parasitism of the cotton root rot pathogen *Phymatotrichopsis omnivora*. *Fungal Biology*, 119(4), 264-273.

- Gupta, V., Schmill,M., Herrera-Estrella,A., Upadhyay,R.S., Druzhinina,I, y Tuohy,M.(2014). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier: Great Britain.
- Handelzman,J., Stabb, E.V.(1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*, 8, 1855-1869.
- Harman,G-E., Howell,C-R., Viterbo,A., Chet,I, y Lorito,M.(2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2,43-56.
- Harman,G.E.(2006).Overview of mechanism and uses of *Trichoderma spp*. *Phytopatology*, 96, 190-194.
- Herrera-Estrella,A., y Chet,I.(2003). The biological control agent *Trichoderma* from fundamentals to applications.In: Arora,D.(Ed).*Handbook of Fungal Biotechnology*, Dekker, New york, 1000-1020.
- Hidalgo,K., y Suárez, C.(S/F). Uso de *Trichoderma spp* para el control del complejo Moniliasis-Escoba de bruja del Cacao en Ecuador. Ecuador:Estación Experimental Tropical Pichilingue .
- Hirano, S., y Nagao, N.(1989). Effect of chitosan, peptic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry*,53, 3065–3066.

- Hui, T.(2013).Morphological Characterization and Sequence Analysis of 5.8s-ITS region of Trichoderma Species. (Thesis Dissertation). Retrieved from <http://eprints.utar.edu.my/844/1/BT-2013-09ADB03477-1.pdf>
- Hwang, J., y Benson,D.M.(2001). Resistance of poinsettia cultivars against Rhizoctonia stem not induced by binucleate Rhizoctonia. *Phytopathol* , 91, S41.
- IICA.Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2006). Protocolo estandarizado de oferta tecnológica para el cultivo de cacao en Perú. Lima, Perú.
- Jaimes,Y., y Aranzazu,F.(2010). Manejo de las enfermedades del Cacao (*Theobroma Cacao L*) en Colombia, con énfasis en la monilia (*Moniliophthora Roreri*).Colombia.Corpoica.
- Suarez-Lopez,J., Checkoway,H., Jacobs,D., Al-Delaimy,W., y Gahagan,S.(2017). Potential short-term neurobehavioral alterations in children associated with a peak pesticide spray season: The Mother’s Day flower harvest in Ecuador, In NeuroToxicology, Volume 60, 2017, Pages 125-133, ISSN 0161-813X, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.02.002>.
- Khan,F.I., Rahman,S., Queen,A., Ahamad,S., Ali,S., Kim,J., y Hassan,M.I.(2017). Implications of molecular diversity of chitin and its derivatives. *Appl. Microbiol, Biotechnol*, 101, 3513-3536.
- Kubicek, C., y Harman,G.(1998). Trichoderma and Gliocladium.Taylor & Francis Ltd:USA.Vol 1.

- Locatelli,G.O., Dos Santos, G.F., Botelho,P.S., Luna, C., y Avallone,L.(2017). Development of *Trichoderma* sp. In encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biological Control*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.020>
- López-Mondéjar,R., Blaya,J., Obiol,M., Ros,M., y Pascual,J.(2012). Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: In vitro and greenhouse nursery experiments. *Pesticide Biochemistry and Physiology*,103.1-8.
- Lopez,R., Blaya,J., Obiol,M., Ros,.M., y Pascual,J.(2012). Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: In vitro and Greenhouse nursery experiments . *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103, 1-8.
- Maldonado,J.(2016). Microencapsulación de hongos endófitos de Cacao del género *Trichoderma* en biopolímeros para el control biológico de fitopatógenos de este cultivo.(Tesis de Posgrado). Universidad Estatal de Guayaquil, Guayaquil.
- Marz,D.H.(1972). Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Ann.Rev.Phytopathol*,10, 429-454.
- Meléndez, L. (1993). Microambiente, cantidad de esporas en el aire e incidencia del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif&Par). Evans et al. Bajo tres sistemas de manejo de sombra leguminosa en cacao (*Theobroma cacao* L). Tesis de Magister Scientiae en Ciencias

Agrícolas y Recursos Naturales. Universidad de Costa Rica. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Merlier, A.M.O, Boire,J.M., Pons,J.B., y Renaud,M.C.(1984). European Patent Applications Patent Applicatio EP I24388 (Chemical Abstracts 183747r.102)

Merlier,A.M., Boire,J.M., Pons,J.B., y Renaud,M.C.(1984). European Patent Application EP 124388 (Chemical Abstracts 183747r, 102,1985)

Mohammad,K.(2007). Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscosimeter constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscosimetric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68, 477-488.

Montoya, J.(2010). Comparación de un grupo de de clones de cacao tipo Nacional vs el CCN-51 bajo condiciones de secado en la zona de Quevedo. (Tesis de Pregrado). Universidad Agraria del Ecuador, Quevedo.

Muñoz,J.E.(2012). Caracterización molecular y funcional de *Trichoderma spp.* Recolectadas en fincas orgánicas de la región sierra del Ecuador.(Thesis Dissertation). ESPE.

Najar,T., y Thomas, S.(2001). El efecto de los microorganismos eficaces en la supresión del hongo *Moniliphthora Roreri* bajo condiciones de laboratorio y campo con inoculación artificial. Tesis. Ing. Agr. Guácimo, Costa Rica. Universidad Earth.6p.

- Nelson,E.B.(1990). Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant Soil*, 129, 61-73.
- Neumann,K., Abdel-Lateff,A., Wright,A.D., Kehraus,S., Krick,A., y König,G.M.(2007). Novel sorbicillin derivatives with an unprecedented carbon skeleton from sponge-derived fungus *Trichoderma* Species. *Eur. J.Org.Chem.* 2007, 2268-2275.
- Norzita,Y., Norhashidah, T., Maznah,M., Nurul-Aizam, I-M., Nor-Akma, S., y Norafifah,A-F.(2013). Determination of viscosity-average molecular weight of chitosan using intrinsic viscosity measurement. *Journal of Nuclear and Related Technologies*, 10(1),39-44.
- Odukkathil,G y Vasudevan,N.(2013) .Toxicity and Bioremediation of pesticides in agricultural soil. *Rev Environ Sci Biotechnol*.
- Papineau,A.M., Hoover,D.G., Knorr,D., y Farkas,D.F.(1991). Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 5(1), 45-47.
- Park, Y., Mi-Hyun,K., Park, S-C., Cheong, S., Jang,M., Nah,J., y Hahm, K.(2008). Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-Chitosan. *Microbial Biotechnology*, 18(10), 1729- 1724.
- Parke,J.L., Rand,R.E., Joy,A.E., y King,E.B.(1991). Biological Control of *Pythium* damping off and *Aphanomyces cepacia* or *P.fluorescens* to seed. *Plant Dis*, 75, 987-991.

Pavinatto, A., Pavinatto, F., Delezuk, J., Nobre, T., Souza, A., Campana, S., y Oliveira, O. (2013). Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 48-53.

Peerson, CH. (1974). *Disposita methodica fungorum*. Römer's Neues Mag Bot 1, 81-128.

Pesticides: Evaluation of Environmental Pollution

Philibert, T., Lee, B.H., y Fabien, N. (2017). Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181, 1314-1337.

Philips-Mora, W.; Ortiz, C.F.; y Aime, M.C (2006a). Fifty years of frosty pod rot in Central America: Chronology of its spread and impact from Panamá to Mexico. In proceedings 15th International Cocoa Research Conference [San José, Costa Rica, 9-14 October 2006]. Cocoa Producers' Alliance (COPAL)/CATIE, 11p.

Philips-Mora, W. (2006). La moniliasis del Cacao: un enemigo que debemos y podemos vencer. Taller regional andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao. Quevedo, Ecuador, 21-25.

Phillips-Mora, W. (2003). Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao fungus *Moniliophthora roreri* as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. PhD thesis. Reading, UK: University of Reading.

- Pico,J., Calderón,D., Fernández, F., y Díaz,A.(2012). Guía de Manejo Integrado de Enfermedades de Cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en la amazonía. INIAP, Orellana-Ecuador.
- Prabakaran, G., Hoti,S.L.(2008). Immobilization in alginate as a technique for the preservation *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* for long term preservation. *Journal of Microbiological*, 72, 91-94.
- Rifai,M.A.(1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol Pap.* 116, 1-56.
- Ruano,D., Del Moral-Navarrete,L., y López-Herrera,C.J.(2003). Estudio de Temperaturas de crecimiento in vitro en aislados de *Trichoderma* spp. y de *Rosellinia Necatrix*. Evaluación del antagonismo mediante cultivos duales. *Proceedings V World Avocado Congress*, 525-529.
- Sáez,M.I., Barros,A.M., Vizcaíno, A,J., López,G., Alarcón, F.J., y Martínez, T.F.(2015). Effect of alginate and chitosan encapsulation of the BSA protein delivered orally to gilthead sea bream(*Sarus aurata*). *Animal Feed Science and Technology*, 210, 114-124
- Samuelian,S.(2016). Potential of *Trichoderma harzianum* for control of banana leaf fungal pathogens when applied with a food source and an organic adjuvant. *Biotech*, 6(1), 1-11.

- Sayari,N., Sila,A., Abdelmalek,B.E., Abdallah,R.B., Ellouz-Chaabouni,S., Bougatef,A., y Balti,R.(2016). Chitin and chitosan from the Norway lobster by products: antimicrobial and anti-proliferative activities, *Int. J. Biol. Macromol*, 87, 163- 171.
- Severin,N., Modeste,S., O'donovanb, A., Raymond,F., Ngonkeu, E., Nana Wakam, L., Etoa, F-X., y Nwaga,D.(2017). Antagonism of *Trichoderma Asperellum* against *Phytophthora megayarka* and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. *An international Journal of Fungal Biology*,8(2), 84-92.
- Shankar, D.I., Kurtköbe, L.M., Gillespie-Sasse, M.J., Rowland,C.Y., y Sivasithamparam, K.(1994). Possible roles of competition for thiamine, production inhibitory compounds and hyphal interactions in suppressions of the take-all fungus by a sterile red fungus. *Can.J.Microbiol*,40, 478-483.
- Shuai, H-H., Yang,C-Y., Harn,H., York,R., Liao, T-C., Chen, W-S., Yeh, J-A., y Cheng,C-M.(2013). Using Surfaces to Modulate the Morphology and Structure of Attached Cells – a case of Cancer Cells on Chitosan Membranes. *Chemical Science*, 8, 3058-3067.

- .Simon C, y Sivasithaparam M. (1988). Interaction among *Gaeumannomyces graminum* var. *tritici*, *Trichoderma koningii* and soil bacteria. *Can J Microbiol.* 34, 871–876.
- Sneb,B.(1998). Use of non-photogenic or hypovirulent fungal strains to protect plants against closely related fungal photogens. *Biotechnol.Adv.*, 16, 1-32.
- Solis,K., y Suárez-Capello, C.(2010). Uso de *Trichoderma* spp. para el control complejo Moniliasis.Escoba de bruja del cacao en Ecuador. INIAP,Estación Experimental Tropical Pichiligue.
- Suslow,T.V., y Scotch, M.N.(1982). Rizhobacteria of sugar beets: effects of seed applications and root colonization of yield. *Phytopathol*, 72, 199-206.
- Tamura,A., Kotani,H., y Naruto,S.(1975). Trichoviridin and dermandin from *Trichoderma* sp. TK-1. *Journal of Antibiotics*, 28, 161-162.
- Thiele, H., y Andersen, G.(1955). Ionotrope Gele von Polyuronsäuren. *Colloid & Polymer 748 Science* 140, 76–102.
- Thomashow,L-S., y Weller, D-M., (1996). Currents concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifunga metabolites. G.Stancey y N. T.Keen (eds). *Plant Microbe interactions*, 1,187- 234.
- Tulasne, L.R., y Tulasne, C.(1865). *Selecta fungorum* Carpología. Jussu, París.

- Van Loon, L.C., y Van Loon, L.C.(1998). Biotechnology as a means to improve biological control of plant diseases. Proceedings: Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent, *Provincial Court*, 63, 1657-1666.
- Vemmer, M., y Patel, A.V.(2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>
- Vemmer,M., y Patel, A.(2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control.*Biological Control*, 67(3), 389-389.
- Vinale,F et al.(2007). Trichoderma-plant.phatogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*,40, 1-10.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., y Harding, S.E.(2010). Materials for encapsulation, in: Zuidam, 782 N., Nedović, V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and 783 Food Processing*, 31–100.
- Weller, D-M., y Thomashow,L-S.(1993). Use of Rhizobacteria for biocontrol. *Curr.Opin. Biotechnol*, 4, pp.306-311.
- Yamano, T; Hemmi,S; Yamamoto,I; y Tsubaki,K(1970). Trichoviridin, a new antibiotic. *Japanese Kokai* 70 15435 (Chemical Abstracts 73, 65093).

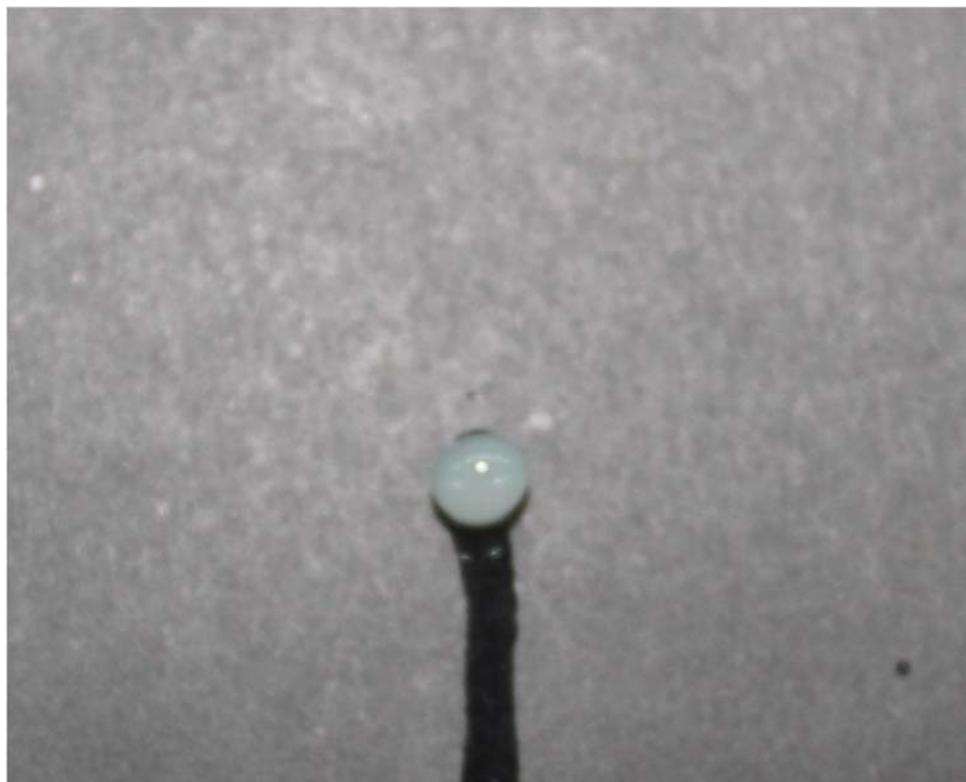
Younes,I, y Rinaudo,M.(2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. *Structure, properties and applications, Mar. Drugs* 13, 1133-1174

Zak,B.(1964). Role of mycorrhizae in root disease. *Ann.Rev.Phytopathol.*, 2, pp. 377-392.

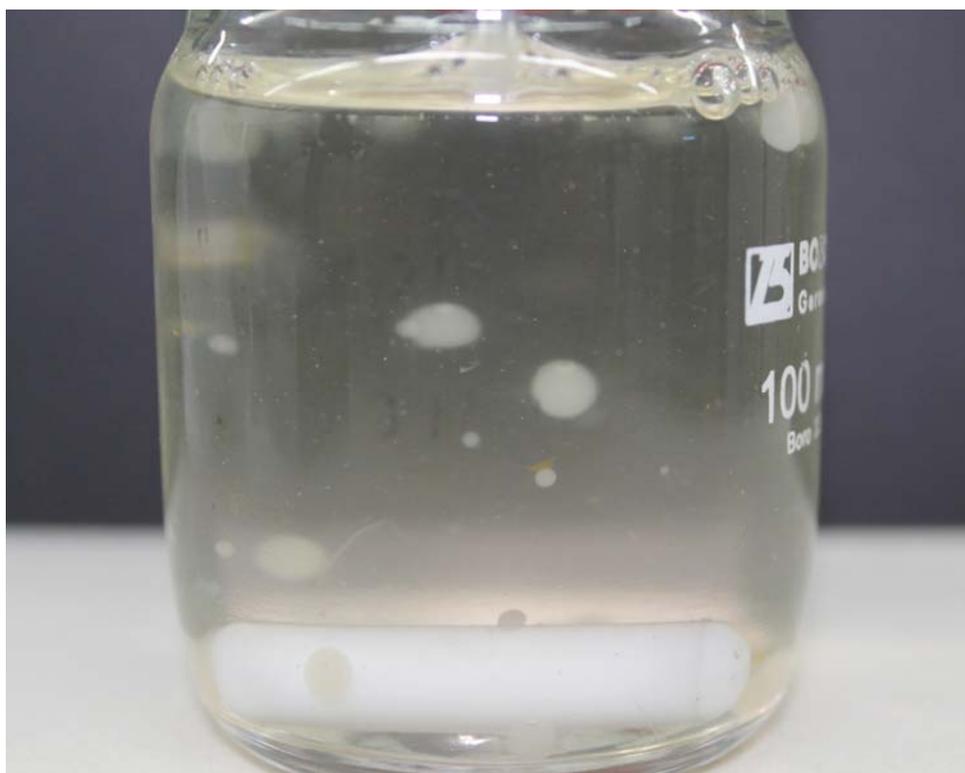
Zavala-González ,E., Lopez-Moya,F., Aranda-Martinez, A., Cruz-Valerio, M., Lopez-Llorca, L., y Ramírez-Lepe, M.(2016).Tolerance to chitosan by Trichoderma Species is associated with low membrane fluidity. *Journal of Basic Microbiology*, 56, 1-9.

10. ANEXOS

10.1. Partícula biopolimérica con *T. asperellum* y quitosano encapsulado



10.2. Partículas formadas en solución de ácido acético y cloruro de sodio.



10.3. Quitosanos utilizados



Quitosano de Aldrich (Low Molecular Weight)



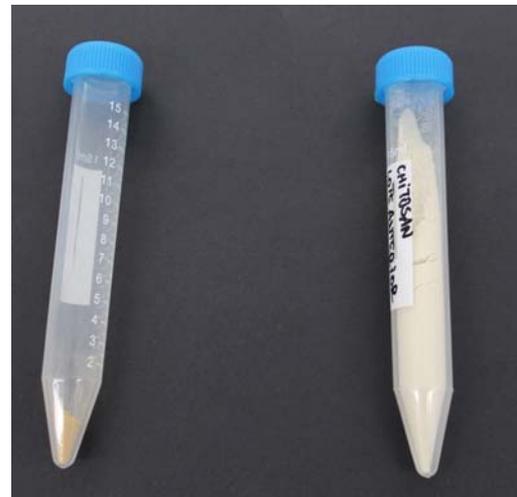
Quitosano de Sigma (From Shrimp Shells)



Quitina Extraída

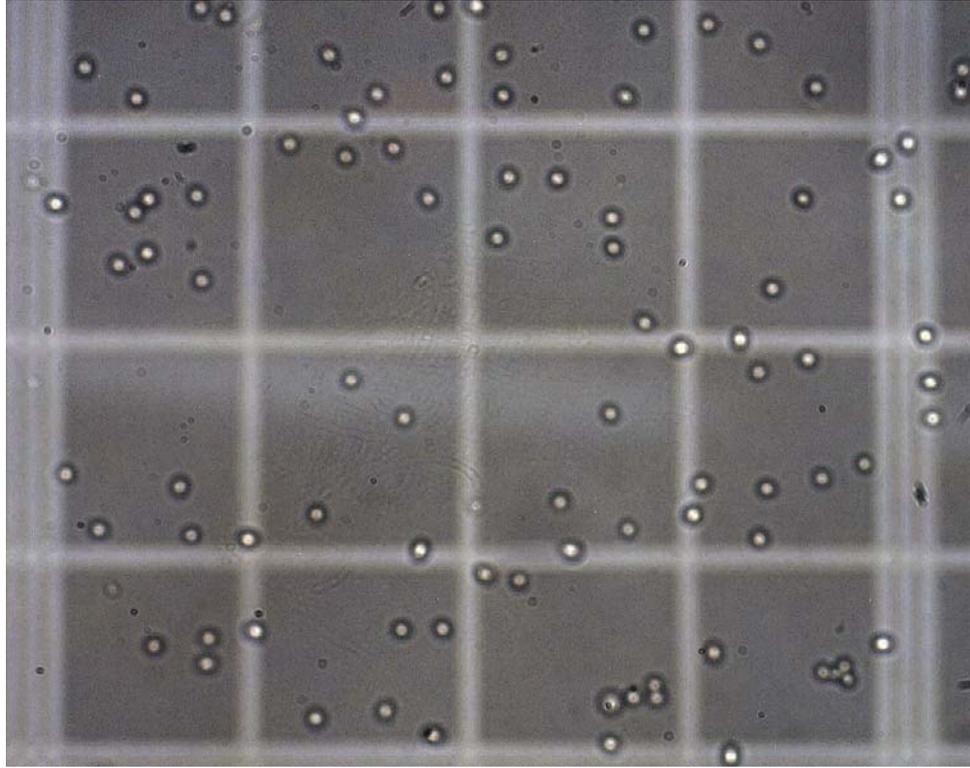


Quitosano Extraído

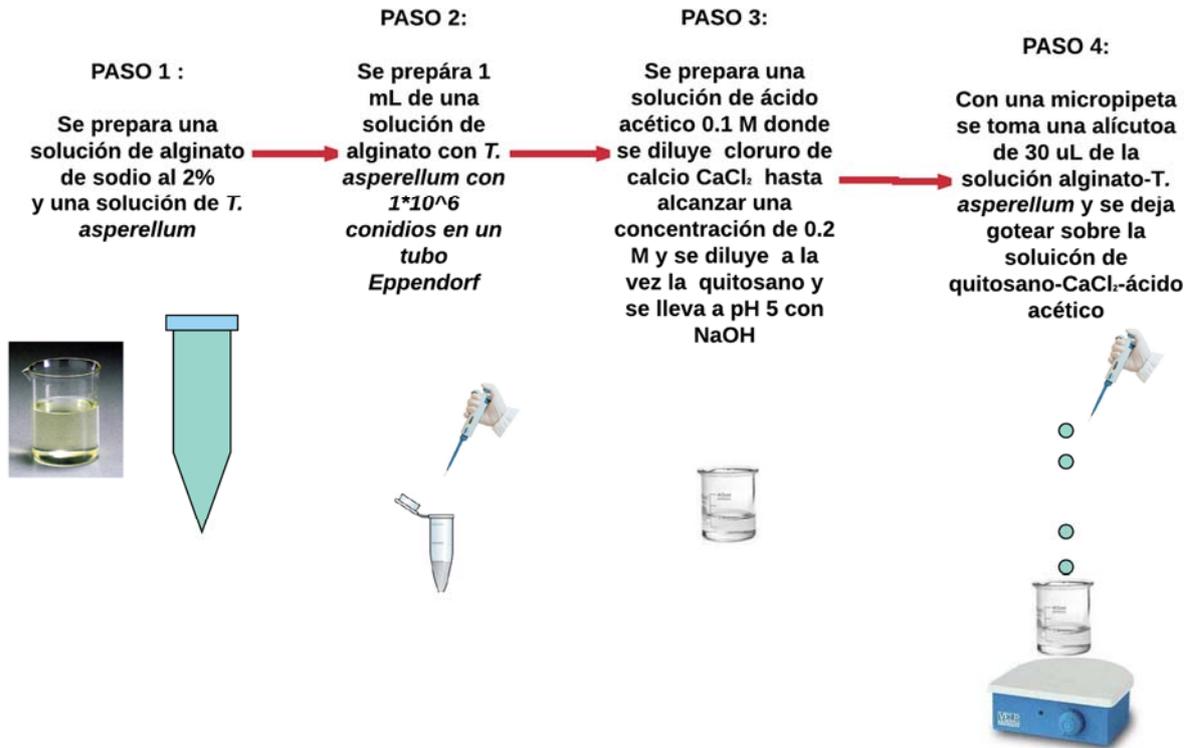


Quitosano de China (Café y Amarillo).

10.4. Conteo de conidios de *T. asperellum* en la cámara de Neubauer



10.5. Protocolo de elaboración de partículas biopoliméricas



10.6. Gráficas de caracterización por viscosimetría capilar

10.6.1. Quitosano extraído.

Se graficó las viscosidades reducidas en función de las concentraciones de quitosano extraído disueltas. Se aplicó una regresión lineal dando las respectivas ecuaciones para cada muestra.

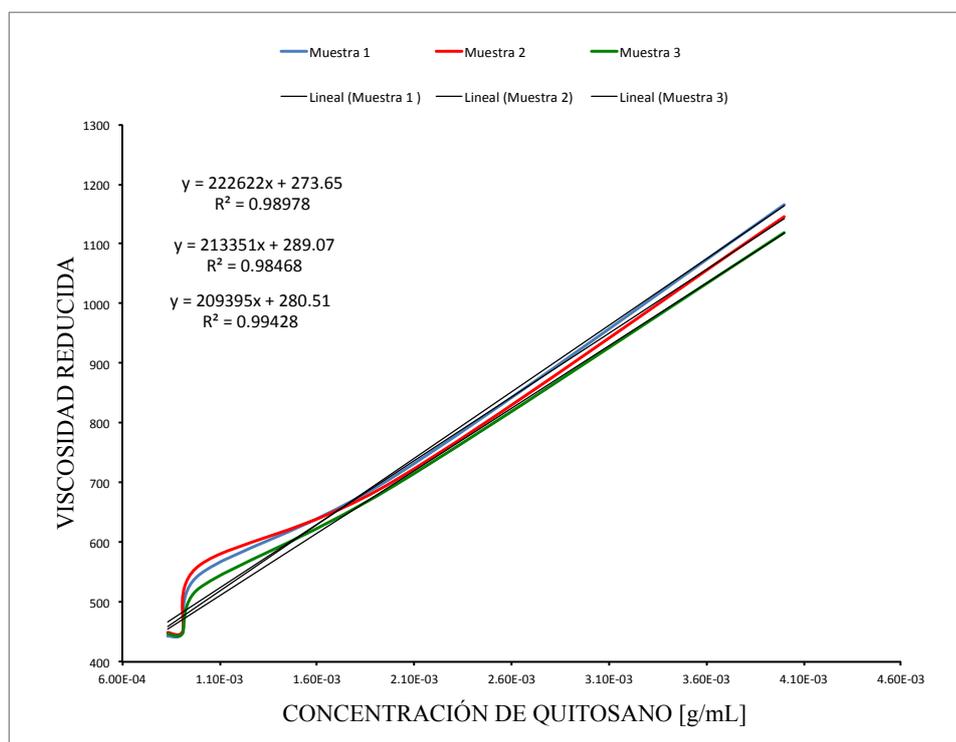


Figura 21: Viscosidades reducidas en función de concentración de quitosano extraído y ecuaciones lineales obtenidas.

A partir de las ecuaciones lineales especificadas en la figura 7 y aplicando la fórmula de Mark-Houwink-Sakurada (Mohammad, 2007), se encontró el peso molecular promedio.

Tabla 13: Peso molecular calculado para el quitosano extraído en el Laboratorio de Química de la Universidad San Francisco de Quito.

Nº	Viscosidades Reducidas cuando t=0	Peso Molecular [kDa]
Muestra 1	273.65	371.00
Muestra 2	289.07	393.53
Muestra 3	280.51	381.01
Promedio		381.84 ± 11.29

10.6.2. Quitosano de Sigma(Chitosan from Shrimp Shells).

Se graficó las viscosidades reducidas en función de las concentraciones de quitosano de Sigma (Chitosan from Shrimp Shells). Se aplicó una regresión lineal dando las respectivas ecuaciones para cada muestra.

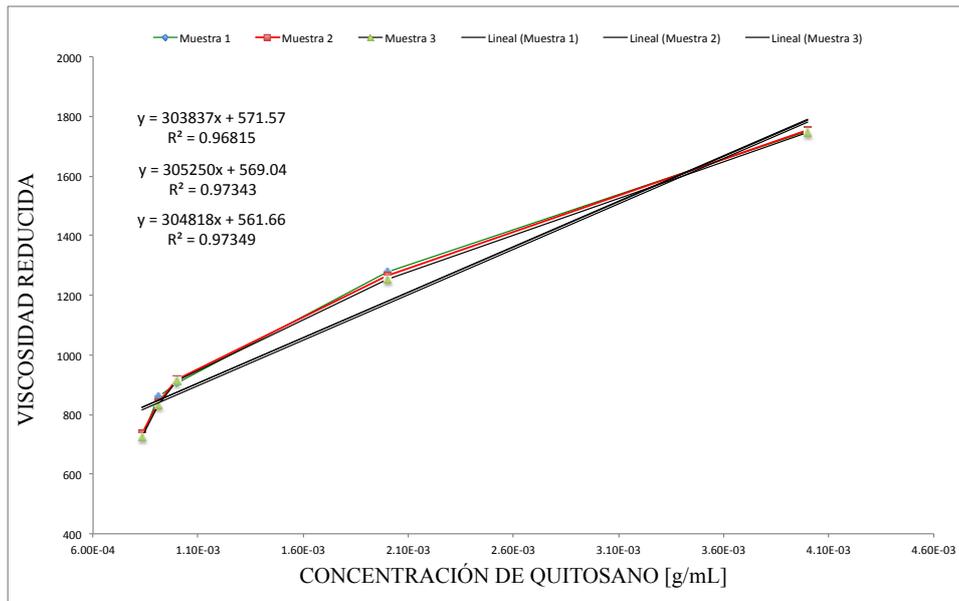


Figura 22: Viscosidades reducidas en función de concentración de quitosano de Sigma(Chitosan from Shrimp Shells) y ecuaciones lineales obtenidas.

A partir de las ecuaciones lineales especificadas en la figura 8 y aplicando la fórmula de Mark-Houwink-Sakurada (Mohammad, 2007), se encontró el peso molecular promedio.

Tabla 14: Peso molecular calculado para el Quitosano de Sigma (Chitosan from shrimp shells) .

Nº	Viscosidades Reducidas en t=0	Peso Molecular [kDa]
Muestra 1	571.57	819.07
Muestra 2	569.04	815.18
Muestra 3	561.66	803.81
Promedio		812.69±7.93

10.6.3. Quitosano de Aldrich (Low molecular Weight).

Se graficó las viscosidades reducidas en función de las concentraciones de quitosano de Aldrich(Low molecular weight). Se aplicó una regresión lineal dando las respectivas ecuaciones para cada muestra.

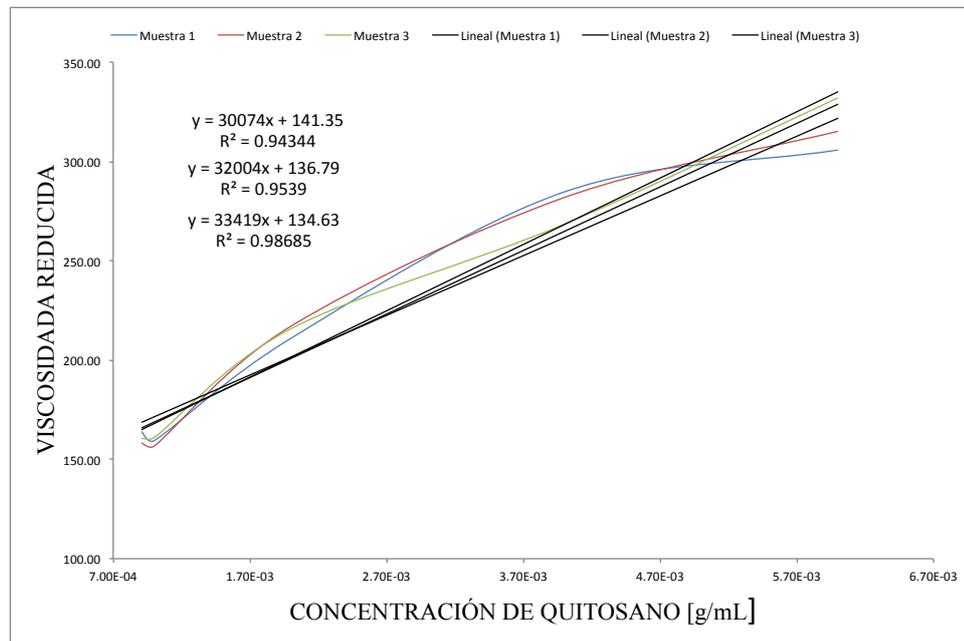


Figura 23: Viscosidades reducidas en función de concentración de quitosano de Aldrich (Low molecular Weight) y ecuaciones lineales obtenidas.

A partir de las ecuaciones lineales especificadas en la figura 9 y aplicando la fórmula de Mark-Houwink-Sakurada (Mohammad, 2007), se encontró el peso molecular promedio.

Tabla 15: Peso molecular calculado para el Quitosano de Aldrich (Low molecular weight).

Nº	Viscosidades Reducidas en t=0	Peso Molecular [kDa]
Muestra 1	141.35	182.34
Muestra 2	136.79	176.02
Muestra 3	134.63	173.03
Promedio		177.13±4.75

10.6.4. Quitosano de China(Color café).

Se graficó las viscosidades reducidas en función de las concentraciones de quitosano de China (Color Café). Se aplicó una regresión lineal dando las respectivas ecuaciones para cada muestra.

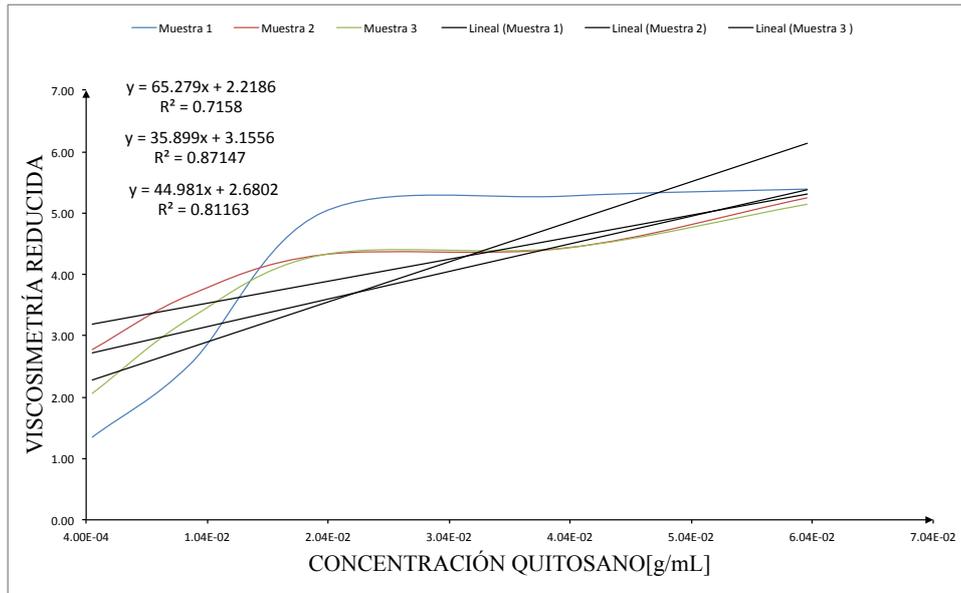


Figura 24: Viscosidades reducidas en función de concentración de quitosano de China(Color café) y ecuaciones lineales obtenidas.

A partir de las ecuaciones lineales especificadas en la figura 10 y aplicando la fórmula de Mark-Houwink-Sakurada (Mohammad, 2007), se encontró el peso molecular promedio.

Tabla 16: Peso molecular calculado para el Quitosano de China (Color Café) .

Nº	Viscosidades Reducidas en t=0	Peso Molecular [kDa]
Muestra 1	2.22	2.09
Muestra 2	3.16	3.06
Muestra 3	2.86	2.75
Promedio		2.63±0.49

10.6.5. Quitosano de China(Color amarillo).

Se graficó las viscosidades reducidas en función de las concentraciones de quitosano lote anterior. Se aplicó una regresión lineal dando las respectivas ecuaciones para cada muestra.

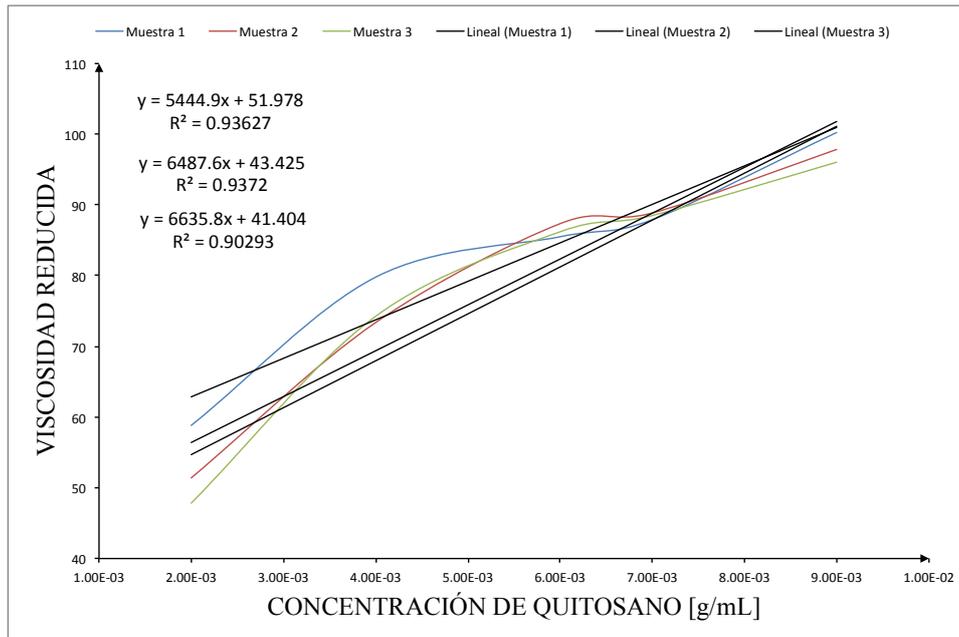


Figura 25: Viscosidades reducidas en función de concentración de quitosano de China (color amarillo) y ecuaciones lineales obtenidas.

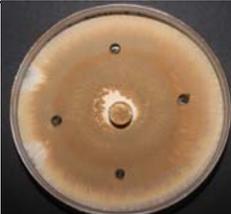
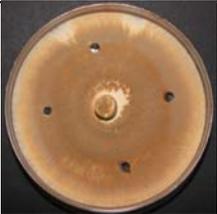
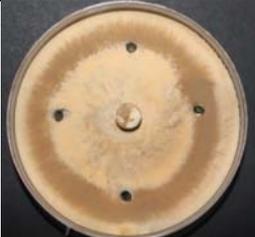
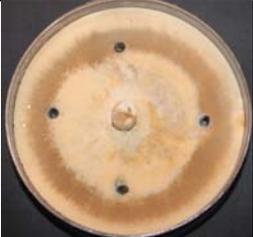
A partir de las ecuaciones lineales especificadas en la figura 11 y aplicando la fórmula de Mark-Houwink-Sakurada (Mohammad, 2007), se encontró el peso molecular promedio.

Tabla 17: Peso molecular calculado para el Quitosano de China (color amarillo)

Nº	Viscosidades Reducidas en t=0	Peso Molecular [kDa]
Muestra 1	51.978	62.19
Muestra 2	43.425	51.26
Muestra 3	41.40	48.70
Promedio		54.05±7.16

10.7. Micoparasitismo con partícula de *T. asperellum* y QTH co-encapsulados.

Tabla 18: Prueba de micoparasitismo con partícula de *T. asperellum* y QTM co-encapsulado.

Concentración de QTH(% p/v)	Día de Cultivo			
	0	3	6	10
0.10%				
0.25%				
0.50%				

10.8. Análisis Estadísticos

Se presenta los análisis ANOVA realizados para el crecimiento de *T. asperellum* donde se describe la significancia de las variables dependientes analizadas.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Crecimiento radial *T. asperellum* (cm)

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	248,026 ^a	44	5,637	31,876	,000
Interceptación	796,530	1	796,530	4504,278	,000
Peso	,420	2	,210	1,187	,310
Concentracion	,409	2	,205	1,157	,319
Tiempo	239,525	4	59,881	338,621	,000
Peso * Concentracion	3,578	4	,894	5,058	,001
Peso * Tiempo	1,875	8	,234	1,326	,241
Concentracion * Tiempo	,450	8	,056	,318	,957
Peso * Concentracion * Tiempo	1,769	16	,111	,625	,856
Error	15,915	90	,177		
Total	1060,471	135			
Total corregido	263,941	134			

a. R al cuadrado = ,940 (R al cuadrado ajustada = ,910)

Figura 26: ANOVA calculado por SPSS cuando la variable dependiente es el crecimiento de *T.asperellum*.

Se muestra la prueba de Tukey al 5% para los valores de concentración de quitosano usados.

Crecimiento radial *T. asperellum* (cm)

HSD Tukey^{a,b}

Concentració Quitosano (%)	N	Subconjunto
		1
0.25	45	2,3560
0.5	45	2,4422
0.1	45	2,4889
Sig.		,296

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 Se basa en las medias observadas.
 El término de error es la media cuadrática(Error) = ,177.

- a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 45,000.
- b. Alfa = .05.

Figura 27: Prueba de Tukey al 5% evaluando la concentración de quitosano.

Se muestra la prueba de Tukey al 5% para los valores de peso molecular de quitosano usados.

Crecimiento radial T. asperellum (cm)

HSD Tukey^{a,b}

Peso molecular Quitosano	N	Subconjunto
		1
Alto	45	2,3782
Medio	45	2,4022
Bajo	45	2,5067
Sig.		,321

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = , 177.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 45,000.

b. Alfa = .05.

Figura 28: Prueba de Tukey al 5% evaluando el peso molecular de quitosano.

Se muestra la prueba de Tukey al 5% para el número de días de incubación.

Crecimiento radial T. asperellum (cm)

HSD Tukey^{a,b}

Tiempo de crecimiento (días)	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
0	27	,0000			
3	27		2,0519		
6	27			2,9963	
9	27				3,5319
10	27				3,5652
Sig.		1,000	1,000	1,000	,998

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = , 177.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 27,000.

b. Alfa = .05.

Figura 29: Prueba de Tukey al 5% evaluando el tiempo de incubación de los cultivos duales.

Se presenta los análisis ANOVA realizados para el crecimiento de *M. roreri* donde se describe la significancia de las variables dependientes analizadas.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Crecimiento radial *M. roreri* (cm)

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	12,043 ^a	44	,274	2,422	,000
Interceptación	1299,211	1	1299,211	11495,556	,000
Peso	4,235	2	2,118	18,736	,000
Concentracion	1,265	2	,633	5,598	,005
Tiempo	4,979	4	1,245	11,014	,000
Peso * Concentracion	1,089	4	,272	2,409	,055
Peso * Tiempo	,097	8	,012	,108	,999
Concentracion * Tiempo	,121	8	,015	,133	,998
Peso * Concentracion * Tiempo	,256	16	,016	,142	1,000
Error	10,172	90	,113		
Total	1321,425	135			
Total corregido	22,214	134			

a. R al cuadrado = ,542 (R al cuadrado ajustada = ,318)

Figura 30: ANOVA calculado por SPSS cuando la variable dependiente es el crecimiento de *T.asperellum*.

Se muestra la prueba de Tukey al 5% para los valores de concentración de quitosano usados.

Crecimiento radial *M. roreri* (cm)

HSD Tukey^{a,b}

Concentración Quitosano (%)	N	Subconjunto	
		1	2
0.5	45	2,9667	
0.25	45		3,1533
0.1	45		3,1867
Sig.		1,000	,885

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,113.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 45,000.

b. Alfa = .05.

Figura 31: Prueba de Tukey al 5% evaluando la concentración de quitosano.

Se muestra la prueba de Tukey al 5% para los valores de peso molecular de quitosano usados.

Crecimiento radial M. royeri (cm)

HSD Tukey^{a,b}

Peso molecular Quitosano	N	Subconjunto	
		1	2
Medio	45	2,9533	
Bajo	45	3,0022	
Alto	45		3,3511
Sig.		,770	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 Se basa en las medias observadas.
 El término de error es la media cuadrática(Error) = ,113.
 a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 45,000.
 b. Alfa = .05.

Figura 32: Prueba de Tukey al 5% evaluando el peso molecular de quitosano.

Se muestra la prueba de Tukey al 5% para el número de días de incubación.

Crecimiento radial M. royeri (cm)

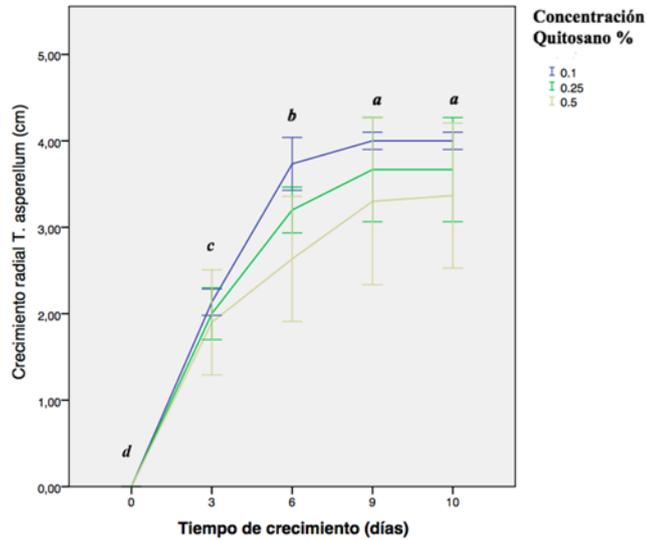
HSD Tukey^{a,b}

Tiempo de crecimiento (días)	N	Subconjunto	
		1	2
0	27	2,7185	
3	27		3,1926
6	27		3,1926
9	27		3,1926
10	27		3,2148
Sig.		1,000	,999

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 Se basa en las medias observadas.
 El término de error es la media cuadrática(Error) = ,113.
 a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 27,000.
 b. Alfa = .05.

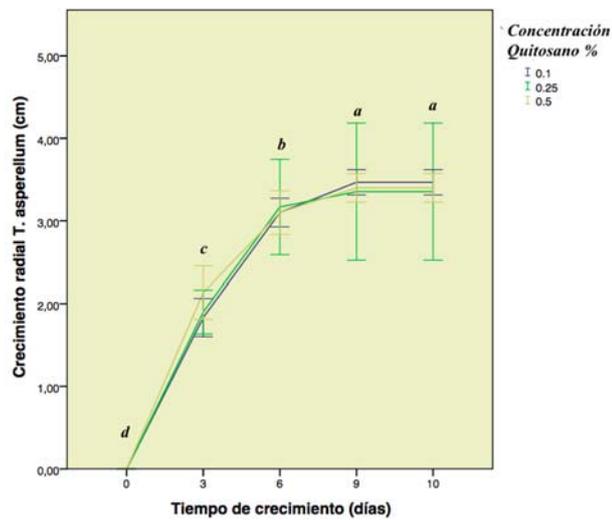
Figura 33: Prueba de Tukey al 5% evaluando el peso molecular de quitosano.

A su vez se muestran las gráficas del crecimiento radial de *T. asperellum* en función de las concentraciones de quitosano encapsuladas para cada tipo peso molecular.



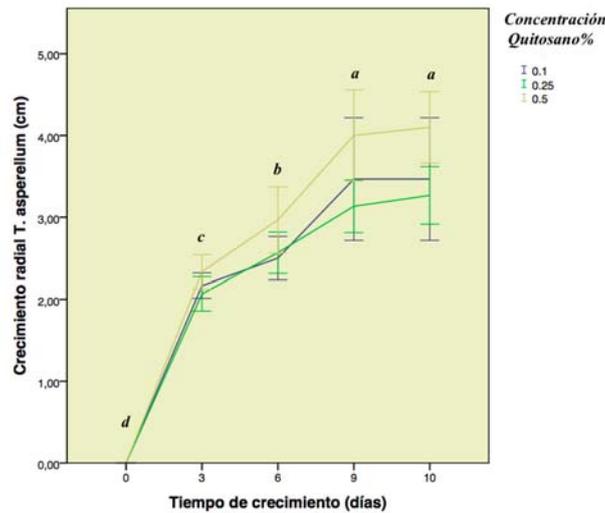
Letras iguales representan medias iguales según la prueba de Tukey al 5%

Figura 34: Crecimiento de *T.asperellum* con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de bajo peso molecular .



Letras iguales representan medias igual según la prueba de Tukey al 5%

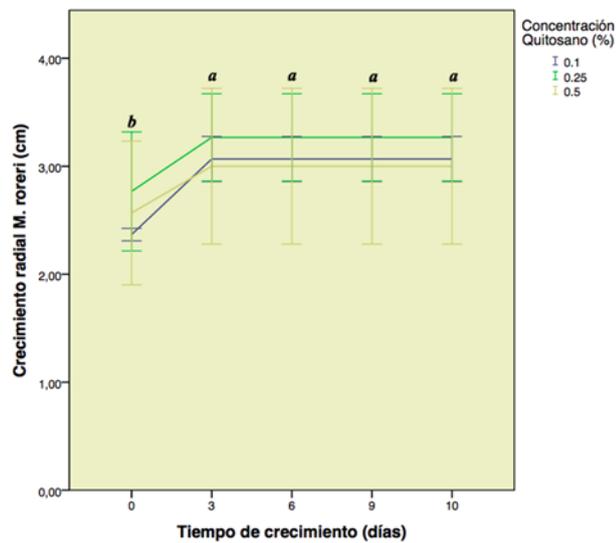
Figura 35: Crecimiento de *T.asperellum* con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de alto peso molecular.



Letras iguales representan medias iguales según la prueba de Tukey al 5%.

Figura 36: Crecimiento de *T.asperellum* con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de peso molecular medio.

Y se muestran las gráficas del crecimiento radial de *M. roreri* en función de las concentraciones de quitosano encapsuladas para cada tipo peso molecular.



Letras iguales representan medias iguales según la prueba de Tukey al 5%.

Figura 37: Crecimiento de *M.roreri* con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de peso molecular bajo.

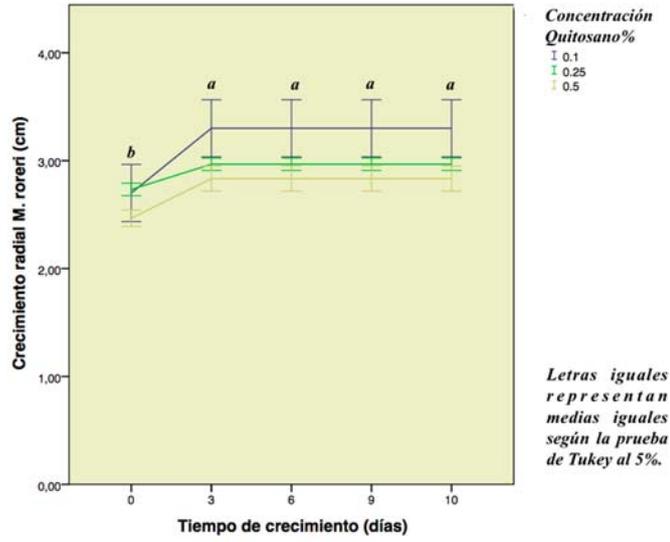


Figura 38: Crecimiento de *M. royeri* con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de peso molecular medio.

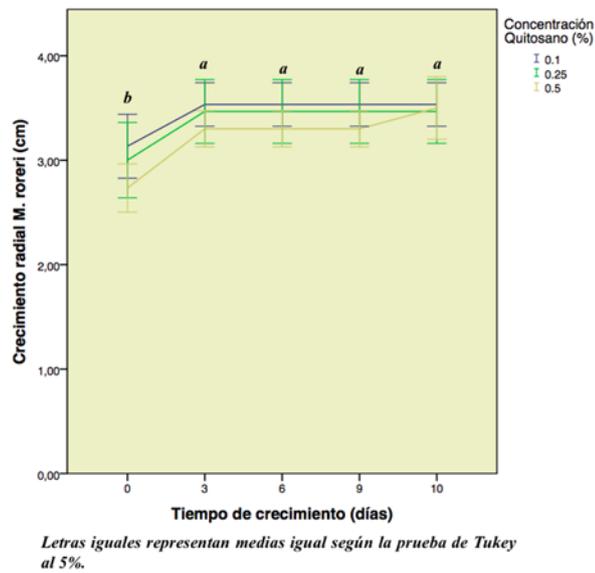


Figura 39: Crecimiento de *M. royeri* con diferentes concentraciones de quitosano cuando el quitosano es de peso molecular alto.

Finalmente se muestra el Anova realizado para los porcentajes de inhibición radial de M. roreri y el gráfico de barra del PIR dado por SPSS.

Porcentaje de Inhibición radial (%)

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control de quitosano de peso molecular medio encapsulado	3	6,9079		
Control de quitosano de alto peso molecular encapsulado	3	9,2187		
Control de Quitosano de bajo peso molecular encapsulado	3	18,1317	18,1317	
Quitosano de alto peso molecular al 0.25%	3		31,3363	31,3363
Quitosano de alto peso molecular al 0.50%	3		32,6568	32,6568
Quitosano de peso molecular medio al 0.10%	3		34,6374	34,6374
Quitosano de bajo peso molecular al 0.25%	3		35,2977	35,2977
Quitosano de bajo peso molecular al 0.10%	3			39,2590
Quitosano de alto peso molecular al 0.10%	3			39,2590
Control Trichoderma sin encapsular	3			39,2661
Quitosano de bajo peso molecular al 0.50%	3			40,5795
Quitosano de peso molecular medio al 0.25%	3			41,2397
Quitosano de peso molecular medio al 0.50%	3			43,8806
Sig.		,616	,097	,455

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Figura 40: ANOVA calculado por SPSS para el porcentaje de inhibición de crecimiento radial.

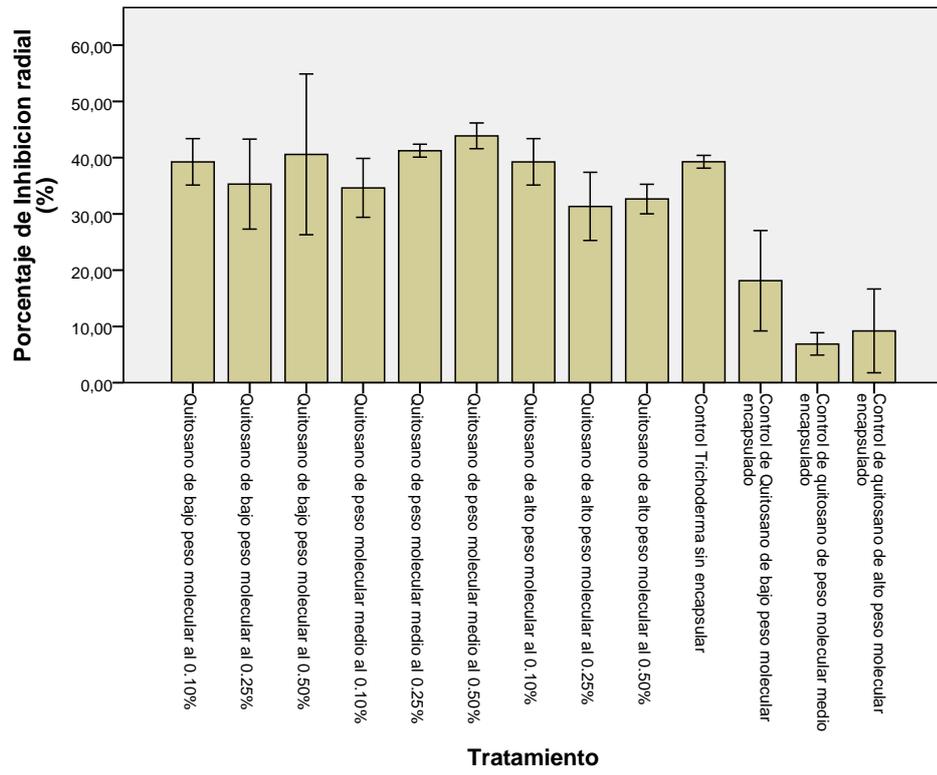


Figura 41: Gráfico de barras de PIC% para los diferentes tratamientos realizados en el antagonismo de *M. roreri*.