



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* microencapsulada frente a *Botrytis cinerea*.

Trabajo de Titulación, Modalidad: Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autora: Jennifer Michelle Guevara Freire

Tutora: Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

Ambato – Ecuador

Septiembre – 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 26 de julio de 2023

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

C.I. 1802726628

TUTORA

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jennifer Michelle Guevara Freire, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las referencias bibliográficas.



Jennifer Michelle Guevara Freire

C.I. 180438309

AUTORA

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Jennifer Michelle Guevara Freire

C.I 180438309

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

María Daniela Garcés Moncayo

C.I. 1803571585

Danae Fernández Rivero

C.I. 1757181209

Ambato, 25 de agosto del 2023

DEDICATORIA

“El éxito es a veces el resultado de toda una serie de fracasos”

-Vincent van Gogh

A Dios.

A mi mami Mis y mi papi Eu, por su infinito amor y paciencia, gracias por no dejar de creer en mí y en lo que puedo alcanzar, este logro es de ustedes papitos.

A mi hermana Alexi, por sus consejos y amor, por ser amiga, compañera y soporte durante toda mi vida y más aún durante este largo proceso.

A mi hermano Patri por siempre estar incondicionalmente conmigo y no dejarme sola.

A mi hermano Nelson.

A las cuatro patitas que siempre me acompañaron en cada desvelo, Fifí.

AGRADECIMIENTO

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Técnica de Ambato y la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, así como a docentes y personal administrativo que fueron parte de este proceso de formación.

De manera especial a mi tutora Mg. Ruth Pérez por su paciencia, enseñanzas y apoyo durante la realización de este proyecto de investigación, gracias por no dejar de creer en mí y por no dejar que me rindiera.

De la misma manera un agradecimiento al PhD. Michel Leiva y a la MVZ Viviana Rodríguez por su sabiduría y ayuda desinteresada y honesta durante la realización de esta investigación.

A cada una de las personas que marcaron esta etapa e hicieron de la universidad, mi lugar feliz, gracias por los momentos vividos, las anécdotas, risas y lágrimas, mis seres de luz Vivi, Cami, Ker, Washo y Josa. Gracias, amigos por las experiencias compartidas y el cariño brindado, Juanito, Josu, Kevito, Abelito, Erick S y Fer. Asimismo a quienes me acompañaron desde que este sueño empezó y su amistad se ha mantenido intacta a través del tiempo, gracias, Pepe y Jean.

Un agradecimiento especial al grupito del 1.1, por hacerme un rinconcito en su laboratorio, brindarme ayuda, construir una amistad tan bonita en tan poquito tiempo y simplemente, estar, gracias, Erick, Nia, Jona, Geo y Vic; que la vida les retribuya todo lo bueno que hicieron por mí.

A todos quienes fueron parte de este bonito proceso y pusieron su granito de arena, quedo eternamente agradecida y sé que la vida nos tiene cosas maravillosas en el camino.

- Dios les pague -

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS	xi
ÍNDICE GENERAL DE TABLAS.....	xii
RESUMEN EJECUTIVO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Justificación.....	1
1.1.2 La mora en el Ecuador	2
1.1.2.1 Enfermedades asociadas a la mora.....	3
1.1.3 <i>Botrytis cinerea</i>	4
1.1.3.1 Generalidades	4
1.1.3.2 Factores de crecimiento.....	5
1.1.3.3 Mecanismos de infección	5
1.1.3.4 Identificación.....	7
1.1.3.5 Control.....	8
1.1.4 <i>Trichoderma harzianum</i>	8
1.1.4.1 Generalidades	8
1.1.4.2 Mecanismo de acción frente a <i>B. cinerea</i>	9
1.1.5 Microencapsulación	10
1.1.5.1 Microcápsulas.....	10
1.1.5.2 Secado por aspersión	11
1.1.5.3 Gelificación iónica.....	11
1.2 Objetivos.....	13
1.2.1 Objetivo General	13
1.2.2 Objetivos Específicos.....	13

1.3	Hipótesis.....	13
1.3.1	Hipótesis Nula.....	13
1.3.2	Hipótesis Alternativa.....	13
CAPÍTULO II.....		14
2.	METODOLOGÍA.....	14
2.1	Materiales.....	14
2.1.1	Equipos de laboratorio.....	14
2.1.2	Reactivos.....	14
2.1.3	Material fungible.....	15
2.2	Métodos.....	16
	Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i> a partir de mora.....	16
	Muestreo de <i>B. cinerea</i>	16
	Recolección de la muestra.....	16
	Criterios de inclusión.....	16
	Criterios de exclusión.....	17
	Aislamiento de <i>B. cinerea</i>	17
	Purificación de <i>Botrytis cinerea</i>	17
	Identificación macroscópica de <i>B. cinerea</i>	17
	Identificación microscópica de <i>B. cinerea</i>	18
	Identificación molecular de <i>B. cinerea</i>	18
	Extracción de ADN.....	18
	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
	Microencapsulación de conidios de <i>T. harzianum</i>	19
	Obtención de la materia prima.....	19
	Preparación de la muestra.....	19
	Producción de conidios.....	20
	Microencapsulación de <i>T. harzianum</i> mediante secado por aspersion.....	21
	Microencapsulación de <i>T. harzianum</i> mediante gelificación iónica.....	21
	Demostración de la actividad antagónica de microcápsulas de <i>T. harzianum</i> frente a <i>B. cinerea</i>	22
	Prueba <i>in vitro</i> del antagonismo entre <i>B. cinerea</i> y <i>T. harzianum</i>	22
	Cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR).....	22
	Análisis estadístico.....	22
CAPÍTULO III.....		23
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23

3.1	Análisis y discusión de los resultados	23
3.1.1	Aislamiento e identificación de <i>B. cinerea</i>	23
3.1.2	Producción de conidios de <i>T. harzianum</i>	28
3.1.3	Microencapsulación de conidios	30
3.1.4	Antagonismo ejercido por <i>T. harzianum</i> frente a <i>B. cinerea</i>	32
3.2	Verificación de hipótesis	37
CAPÍTULO IV		38
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
4.1	Conclusiones	38
4.2	Recomendaciones	39
MATERIAL DE REFERENCIA		40
ANEXOS		48

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1. Mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>)	3
Figura 2. Proceso de infección por parte de <i>B. cinerea</i>	6
Figura 3. Estructura química de las sustancias secretadas por <i>T. harzianum</i>	10
Figura 4. Estructura de una microcápsula.....	10
Figura 5. Proceso de secado por aspersión	11
Figura 6. Proceso de microencapsulación por gelificación iónica.....	12
Figura 7. Método de microcultivo. A) Elementos del microcultivo. B) Muestra asociada a <i>B. cinerea</i> observada mediante lente de 10X..	24
Figura 8. Conidióforos alargados, con ramificaciones irregulares y racimos de conidios al extremo.	25
Figura 9. Conidios en forma de canoa, dispuestos en tres o más celdas.....	25
Figura 10. Conidios globosos, nacen de esporangióforos.....	25
Figura 11. Observación de <i>B. cinerea</i> a través del microscopio óptico con lente 40X, se identifican estructuras características como conidióforos con conidios agrupados en racimo.....	26
Figura 12. Cultivo puro de <i>Botrytis cinerea</i>	27
Figura 13. Electroforesis asociada a la identificación de <i>Botrytis cinerea</i>	28
Figura 14. A) Fermentación sólida de <i>T. harzianum</i> empleando arroz como sustrato. B) Colonización de <i>T. harzianum</i> en el medio.....	29
Figura 15. Diagrama de cajas donde se evalúan los tipos de microencapsulación con respecto al PICR.....	35
Figura 16. Diagrama de cajas donde se evalúan los días de incubación con respecto al PICR.....	36

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1. Principales enfermedades que afectan a la mora.....	3
Tabla 2. Taxonomía de <i>B. cinerea</i>	4
Tabla 3. Taxonomía de <i>T. harzianum</i>	9
Tabla 4. Primer a usar en la identificación de <i>B. cinerea</i>	18
Tabla 5. Principales estructuras encontradas en el cultivo primario, descritas a partir de las claves de Barnett and Hunter (1998)	25
Tabla 6. Biomasa conidial obtenida	30
Tabla 7. Composición del microencapsulado realizado.....	31
Tabla 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial	32
Tabla 9. Pruebas de normalidad datos de PICR de acuerdo con el tipo de microencapsulación con un nivel de significancia del 5%.....	34
Tabla 10. Pruebas de normalidad datos de PICR de acuerdo con los días de incubación con un nivel de significancia del 5%.....	34
Tabla 11. Pruebas de efectos inter-sujetos	35

RESUMEN EJECUTIVO

El cultivo de mora tiene una elevada importancia económica por sus propiedades medicinales y agroindustriales, su producción enfrenta problemas causados por fitopatógenos que provocan pérdidas económicas significativas, dentro de los que destaca *Botrytis cinerea* que ocasiona de la enfermedad de la podredumbre gris. Se ha demostrado el control de este hongo mediante el uso de organismos como *Trichoderma harzianum*, sin embargo, la elaboración de productos a base de este biocontrolador es inestables o poco eficientes, siendo la microencapsulación una excelente alternativa.

Con fines de investigación se obtuvieron conidios de *T. harzianum* mediante fermentación sólida y estos fueron microencapsulados mediante la técnica de secado por aspersión a partir de maltodextrina y goma arábica, la gelificación iónica se realizó mediante el uso de alginato de sodio. Se empleó dos tipos de microencapsulación, así como tres tiempos de incubación, obteniendo como resultado que el tratamiento gelificación iónica a los tres días de incubación fue el mejor con un porcentaje de inhibición de crecimiento radial del 97,087 por ciento seguido de gelificación iónica a los 2 días con un porcentaje de 94,174 por ciento, mientras que el tratamiento por secado por aspersión a los 3 días fue de 85,435 por ciento.

En el presente proyecto de investigación se llevó a cabo la microencapsulación de conidios de *T. harzianum*, evaluando su influencia en el porcentaje de crecimiento radial de *B. cinérea*.

Palabras clave: mora, *Botrytis cinerea*, biocontrol, *Trichoderma harzianum*, microencapsulación.

ABSTRACT

The blackberry crop has a high economic importance due to its medicinal and agroindustrial properties, its production faces problems caused by phytopathogens that cause significant economic losses, among which *Botrytis cinerea* stands out as the cause of gray rot disease. The control of this fungus has been demonstrated by organisms such as *Trichoderma harzianum*, however, the elaboration of products based on this biocontroller is unstable or inefficient, being microencapsulation an excellent alternative.

For research purposes, conidia of *T. harzianum* were obtained by solid fermentation and these were microencapsulated by spray drying technique from maltodextrin and gum arabic, ionic gelation was performed by using sodium alginate. Two types of microencapsulation were used, as well as three incubation times, obtaining as a result that the ionic gelation treatment at three days of incubation was the best with a percentage of radial growth inhibition of 97.087 percent followed by ionic gelation at 2 days with a percentage of 94.174 percent, while the spray-drying treatment at 3 days was 85.435 percent.

In the present research project, microencapsulation of *T. harzianum* conidia was carried out, evaluating its influence on the radial growth percentage of *B. cinerea*.

Key words: blackberry, *Botrytis cinerea*, biocontrol, *Trichoderma harzianum*, microencapsulation.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Justificación

A nivel mundial, la seguridad alimentaria es una temática de gran enfoque, siendo parte del segundo Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS), “hambre cero”. Esta política está basada en garantizar alimentos inocuos y de calidad a través de la agricultura sostenible, llevada de la mano de la salud ambiental (**FAO 2023**). El uso de agroquímicos en contra de plagas presentes en cultivos supone una amenaza para la seguridad alimentaria, afectando a la salud humana y ecosistémica (**Abbey et al. 2019**).

Según el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP), en el Ecuador, la mora tiene una elevada importancia económica debido a su gran producción, aporte nutricional y propiedades agroindustriales. Se reportan alrededor de 5.000 hectáreas de mora pertenecientes a 15.000 productores en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo (**INIAP 2016**).

La mora enfrenta constantes infecciones causadas por patógenos como el moho gris, mildiu polvoso, marchitez descendente y artrópodos plaga. Como menciona **Abbey et al. (2019)** *Botrytis cinerea* es el agente causal del moho gris, considerado como uno de los principales fitopatógenos que afecta a este cultivo, alcanzando niveles de umbral económico altos, lo que representa el rendimiento productivo de la planta con pérdidas ascendentes a un 91,8% (**Marín et al. 2017**).

La agricultura convencional aplica fungicidas para el control de este patógeno, lo que desencadena en el incumplimiento del segundo ODS. La biotecnología

presenta alternativas de control biológico, basado en el uso de organismos vivos con el fin de reducir la población de una plaga a través del antagonismo con un bajo riesgo ambiental y una producción agrícola sustentable (**Hajek and Eilenberg 2004**), como supone el uso de *Trichoderma harzianum*.

T. harzianum es un hongo anaeróbico de crecimiento rápido adaptado a diferentes condiciones ambientales, capaz de controlar innumerables patógenos. El mecanismo de acción de este antagonista permite disminuir la población del hongo *B. cinerea*. incrementando un rendimiento de hasta un 20% en la producción del cultivo (**Pincay, Viera, and León 2020**). Sin embargo, su uso enfrenta la degradación por parte de condiciones externas por lo que es necesario el empleo de alternativas que aseguren su viabilidad.

La microencapsulación es una técnica basada en envolver al microorganismo en un polímero encapsulante que proporciona características protectoras frente a factores como la humedad, temperatura y radiación UV (**Rodrigues et al. 2020**).

1.1.2 La mora en el Ecuador

La mora de castilla (*Rubus glaucus*) es la variedad comercial más producida y vendida dentro del Ecuador, se presenta a manera de arbusto cubierto de espinas y cuyas bayas son un agregado de drupéolas (*Figura 1*). Este fruto es usado ampliamente dentro de la gastronomía ecuatoriana, destaca por su versatilidad a la hora de elaborar platos así como por su contenido nutricional y medicinal (**Romoleroux, Bastidas, and Espinel 2018**).

Los requerimientos edafoclimáticos de este cultivo están dados por una humedad relativamente alta (80-90%), una temperatura de 25°C, pH del suelo ligeramente ácido así como precipitaciones desde 1.500 a 2.500 mm al año (**Iza et al. 2020**).

De acuerdo a datos proporcionados por el **Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (2014)** en Tungurahua las zonas con estas características

edafoclimáticas con mayor producción y comercialización de mora se encuentran ubicadas en los cantones de Santiago de Píllaro seguido por Mocha, Tisaleo, Cevallos y Patate.



Figura 1. Mora de castilla (*Rubus glaucus*)

Tomada de: (INIAP 2014)

1.1.2.1 Enfermedades asociadas a la mora

El cultivo de mora presenta un gran número de enfermedades que causan pérdidas y hace necesario desarrollar medidas de manejo. Las enfermedades más comunes son las que se citan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Principales enfermedades que afectan a la mora

Enfermedad	Agente causal	Sintomatología	Porcentaje de daño
Moho gris	<i>B. cinerea</i>	Pudrición del fruto, manchas grisáceas	91,8%
Mildeo polvoso	<i>Oidium sp.</i>	Mosaico y polvillo blanco en hojas	61,2%
Marchitez descendente	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Verticillium dahlie</i>	Manchas oscuras o púrpuras en frutas y hojas	13,3%

Fuente: (Montoya, Hincapié, and Uribe 1997);(INIAP 2016)

1.1.3 *Botrytis cinerea*

1.1.3.1 Generalidades

B. cinerea es un hongo filamentoso perteneciente a la familia Sclerotiniaceae (Tabla 2), considerado uno de los hongos más peligrosos dentro de la agricultura, comúnmente denominado podredumbre gris. Destaca por su amplia adaptación a las condiciones ambientales, su rango de hospedadores es extenso, siendo capaz de infectar alrededor de 200 especies (Elad and Stewart 2004). Esta enfermedad afecta a las partes aéreas de la planta, como las hojas, los tallos y los frutos produciendo sintomatología como necrosis, pudrición y la muerte (Shao, Zhao, and Ma 2021).

Presenta colonias con una vasta variedad fenotípica donde destacan aquellas blancas grisáceas y amarillentas cuya textura asemeja al terciopelo y/o algodón. Estas características directamente están relacionadas con la humedad y condiciones del medio en el que crece (Gligor 2022). Posee estructuras asexuales y sexuales denominadas conidios y cleistotecios (Elad and Stewart 2004).

Tabla 2. *Taxonomía de B. cinerea*

Reino	Fungi
Clase	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Leotimycetes
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae
Género	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>cinerea</i>

Fuente: (Infante et al. 2009)

1.1.3.2 Factores de crecimiento

Temperatura

Se estima que *B. cinerea* crece en temperaturas que oscilan entre los 10 a 25 °C; **Nair and Allen (1993)** indican que la temperatura óptima de infección en el caso de flores y frutos ronda los 20 a 23 °C. Sin embargo, esta varía dependiendo de la planta hospedadora y las condiciones ambientales en las que esta se desarrolla (**Fedele, Brischetto, and Rossi 2020**).

Humedad

Este factor es de gran importancia dentro del desarrollo y propagación de *B. cinerea*, puesto que este hongo prefiere ambientes con humedad relativa de hasta el 100% así mismo como frutas o especies vegetales con gran contenido de agua (**Fedele et al. 2020**).

pH

B. cinerea puede crecer en un extenso rango de pH, sin embargo, se desarrolla mejor dentro del intervalo de 3,5 a 8,0 prefiriendo los ambientes ácidos (**Wang et al. 2018**).

1.1.3.3 Mecanismos de infección

B. cinerea infecta especies vegetales susceptibles a través de conidios transportados mediante el agua, aire o por insectos. Estas estructuras asexuales se adhieren a heridas o tejido fresco como la cutícula y se mantienen latentes hasta que las condiciones de humedad favorezcan su germinación (**Elad and Stewart 2004**). Este proceso comienza con la producción de un tubo germinativo o conidióforo capaz de adentrarse en el huésped, matar a las células aledañas a la lesión y activar los mecanismos de defensa de la planta por lo que el patógeno

puede mantenerse en estado de quiescencia inducido por proantocianidinas (Petrasch, Silva, et al. 2019).

El hongo supera el efecto de las sustancias secretadas para su control mediante desintoxicación enzimática acompañada de la filtración de nutrientes por parte de las lesiones de la planta. Esto le permite crecer vigorosamente, colonizando el tejido, secretando sustancias fitotóxicas como las poligalacturonasas (Kan 2005). De tal manera que el tejido se recubre de micelio y el proceso comienza de nuevo infectando otra planta u otro hongo del huésped (Figura 2).

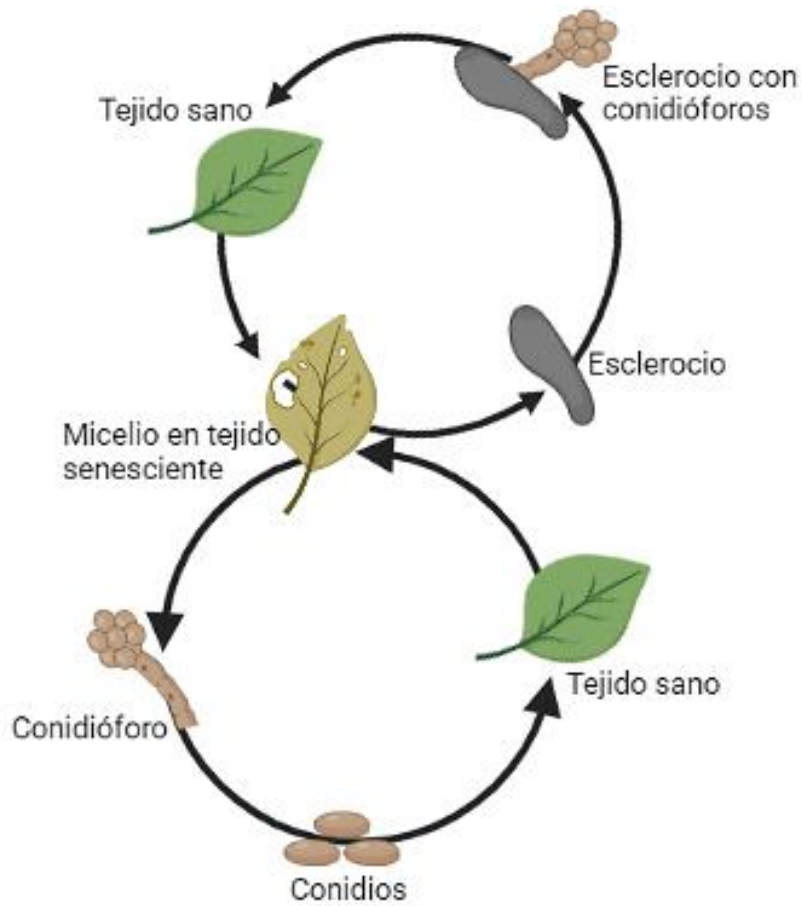


Figura 2. *Proceso de infección por parte de B. cinerea.*

Adaptado de Petrasch et al. (2019)

1.1.3.4 Identificación

Dentro de la identificación de *Botrytis cinerea* una vez establecidas las características asociadas a su infección en el huésped, es necesario el uso de técnicas que permitan esclarecer su identidad.

Técnicas macro y microscópicas

Se basan en divisar las características morfológicas del micelio formado, con ayuda de un microscopio óptico a partir de la prueba de la cinta adhesiva y la tinción con azul de lactofenol, que permiten observar estructuras germinativas a partir de la compatibilidad de estos colorantes con los componentes estructurales del hongo **(Panizo and Moreno 2022)**.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica de identificación se fundamenta en la amplificación selectiva de una parte específica del ADN. Se logra mediante el uso de primers, que son fragmentos cortos de esta molécula, para amplificar el genoma deseado a través de múltiples síntesis de ácido nucleico. Posteriormente, estos segmentos amplificados pueden ser detectados mediante técnicas como electroforesis o tinción con bromuro de etidio **(Costa 2004)**.

Metagenómica

Basada en la secuencia masiva de muestras ambientales mediante la obtención de material genético proveniente de múltiples microorganismo; produce un mínimo de 50 Mb de secuencias, pudiendo identificar un amplio rango de organismos así como las sustancias que secretan **(Ghosh, Mehta, and Khan 2018)**.

1.1.3.5 Control

Prácticas culturales

Se basan en la eliminación de frutos y ramas enfermas, la poda constante permite la aireación de la planta, por lo tanto la humedad relativa disminuye (**Saldarriaga Cardona et al. 2017**). Estrategias como la rotación de cultivos, evitar el riego por aspersión y elegir un sistema de riego acorde a la plantación también inhiben el desarrollo de la enfermedad (Petrasch, Knapp, et al. 2019).

Control químico

En la actualidad se utilizan fungicidas como el dióxido de azufre, boscalid, inhibidores de la succinato deshidrogenasa y de metionina. Se ha propuesto el uso de químicos como el sulfato de amonio, silicato de sodio e incluso el etanol, además de gases de fumigación como el dióxido de cloro (**De Simone et al. 2020**).

Control biológico

Se basa en el uso de microorganismos capaces de controlar e inhibir el crecimiento de un fitopatógeno a través de distintos mecanismos de acción. En el control de *B. cinerea* se encuentran hongos como *Trichoderma harzianum*, y *Ulocladium spp.*, además de bacterias como *Bacillus subtilis.*, *Pseudomonas fluorescens.* y *Clonostachys rosea* (**Abbey et al. 2019**), entre otros.

1.1.4 *Trichoderma harzianum*

1.1.4.1 Generalidades

T. harzianum es un hongo saprófito filamentoso perteneciente a la familia Hypocreaceae (*Tabla 3*). Este hongo cosmopolita se caracteriza por tener un micelio blanquecino que tiende a tornarse de color verde y cuyas condiciones de

crecimiento están dadas por un pH ácido, una temperatura de 25°C y una humedad relativamente alta (Romero-Arenas et al. 2009).

Este organismo se caracteriza por un crecimiento rápido con una reproducción asexual mediada por esporas (conidios) formando clamidosporas de color verde y aspecto parecido a una red. *T. harzianum* se caracteriza por poseer varios mecanismos de control frente a patógenos como el micoparasitismo, competencia por sustrato, antibiosis, entre otros (Romero-Arenas et al. 2009).

Tabla 3. *Taxonomía de T. harzianum*

Reino	Fungi
Clase	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	<i>Hypocreaceae</i>
Género	<i>Trichoderma</i>
Especie	<i>harzianum</i>

Fuente: Romero and Costa (2016)

1.1.4.2 Mecanismo de acción frente a *B. cinerea*

T. harzianum por su acelerada tasa de crecimiento y conidiación es capaz de colonizar rápidamente el medio, movilizar y tomar todos los nutrientes presentes, además el género *Trichoderma*. es altamente resistente a controladores sintéticos a comparación de *B. cinerea* (Hjeljord, Stensvand, and Tronsmo 2001).

Por otra parte, este biocontrolador micoparásita directamente a *B.cinerea* por su capacidad quimiotrópica de crecimiento que en conjunto con la antibiosis, permite que a partir de compuestos como el ácido harziánico y el 6-pentil-a-pirona (Figura 3) (Mesa, Marín, and Calle 2020), *T. harzianum* se adhiera al patógeno enrollándose en él, degrada los componentes de la pared celular, gracias a enzimas

líticas penetra estructuras internas como el citoplasma, se nutre de estas y el patógeno es controlado (Infante et al. 2009).

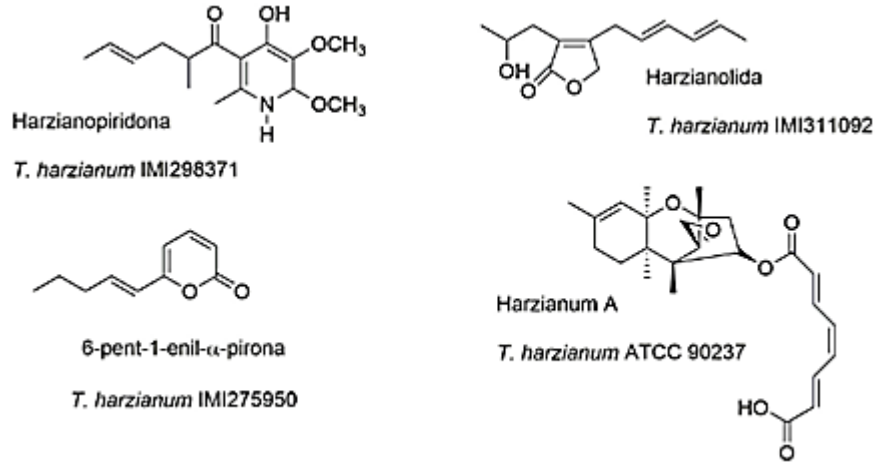


Figura 3. Estructura química de las sustancias secretadas por *T. harzianum*

Tomada de: Mesa et al. (2020)

1.1.5 Microencapsulación

1.1.5.1 Microcápsulas

El producto final de la microencapsulación se denomina microesfera o microcápsula, pueden tener un tamaño de una micra hasta milímetros y cuya pared de recubrimiento es uniforme. El compuesto protegido en el interior se denomina núcleo mientras que la pared se denomina membrana (Figura 3) (Mali Snehal et al. 2013).

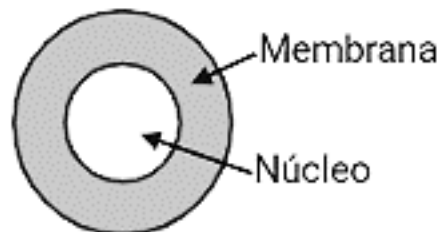


Figura 4. Estructura de una microcápsula

1.1.5.2 Secado por aspersión

La microencapsulación mediante secado por aspersión es un proceso económico comúnmente usado dentro de la industria alimenticia y farmacéutica. Consiste en que la sustancia de interés se encuentre en un estado fluido en contacto con la mezcla polimérica de tal manera que se puedan formar partículas al ser atomizado. Este proceso se da mediante una boquilla de pulverización. Finalmente en el secador por aspersión, las altas temperaturas permiten la evaporación del solvente, obteniendo microcápsulas (*Figura 4*) (Mali Snehal et al. 2013).

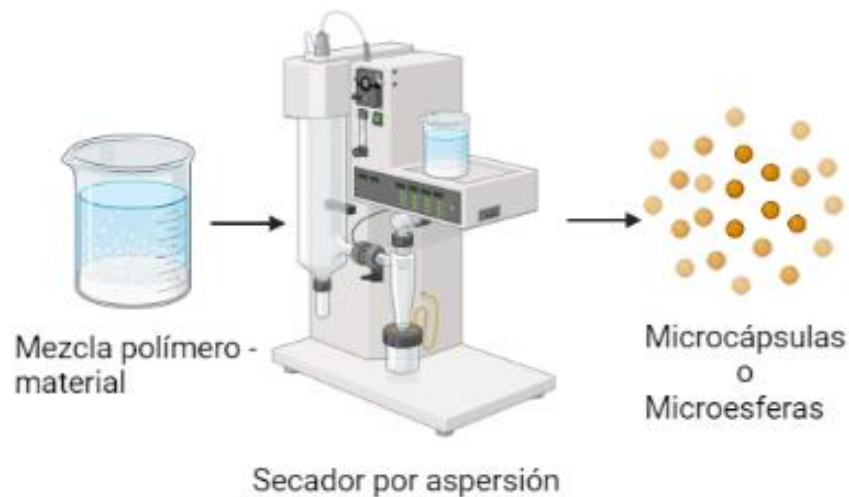


Figura 5. Proceso de secado por aspersión

1.1.5.3 Gelificación iónica

Este proceso es ampliamente utilizado, principalmente por la facilidad de su aplicación al no utilizar solventes orgánicos ni temperaturas elevadas reduciendo su costo. El material de recubrimiento o polímero polielectrolito suele ser el alginato de sodio por poseer propiedades bioactivas de protección. Este al encontrarse en presencia de iones divalentes forma la película que recubre al núcleo (Cortés-Camargo et al. 2023) formando así microcápsulas (*Figura 5*).



Figura 6. *Proceso de microencapsulación por gelificación iónica*

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* microencapsulada frente a *Botrytis cinerea*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Aislar cepas de *Botrytis cinerea* a partir de mora.
- Microencapsular conidios de *Trichoderma harzianum* mediante secado por aspersion y gelificación iónica.
- Demostrar la actividad antagónica de microcápsulas de *Trichoderma harzianum* frente a *Botrytis cinerea* a través de pruebas *in vitro*.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Hipótesis Nula

El tipo de microencapsulación de conidios de *Trichoderma harzianum* así como el tiempo de incubación no influyen en la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea*.

1.3.2 Hipótesis Alternativa

El tipo de microencapsulación de conidios de *T. harzianum* así como el tiempo de incubación influyen en la inhibición del crecimiento de *B. cinerea*.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales

Los materiales usados durante el desarrollo de la presente investigación se presentan a continuación:

2.1.1 Equipos de laboratorio

- Balanza analítica
- Mini Spray Dryer
- Bio-Rad
- Microscopio óptico
- Vórtex
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Plancha de agitación y calentamiento
- Micropipetas
- Incubadora
- Microondas
- Refrigerador
- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder para cámara de electroforesis
- Termociclador
- Transiluminador

2.1.2 Reactivos

- Agar Papa Dextrosa

- Agar Malta
- Agar
- Agua destilada
- Agarosa
- Agua ultrapura estéril
- Lactofenol
- Dreamtaq Green PCR máster MIX 200 RX Thermo Scientific
- Etanol 70%
- Etanol 90%
- Gentamicina
- Bromuro de etidio
- Maltodextrina
- Goma arábica
- Alginato de Sodio
- Cloruro de Calcio
- Genejet Genomic DNA Purification Kit

2.1.3 Material fungible

- Probetas
- Botellas Boeco
- Vasos de precipitación
- Matraces Erlenmeyer
- Cajas Petri
- Puntas para micropipeta
- Aguja de inoculación
- Arroz
- Mechero de alcohol
- Microtubos Eppendorf
- Gradilla
- Espátula

- Portaobjetos

2.2 Métodos

Aislamiento de *Botrytis cinerea* a partir de mora

Muestreo de *B. cinerea*

- a. Se ubicó el sector con mayor producción de mora en la provincia, según datos del MAGAP y de estas se seleccionaron 4 zonas de prevalencia.
- b. Las muestras fueron compradas a los agricultores debido al alcance comercial que esta planta poseía, como lo indicaba el Anexo 1.
- c. Se eligieron plantas con la infección de *B. cinerea* basado en un muestreo aleatorio simple en zigzag.

Recolección de la muestra

- a. Se reconocieron 32 plantas que poseían la infección.
- b. De estas se tomaron cuatro frutos en estado fenológico de madurez completa con presencia de *B. cinerea* (**Molina, La Rotta, and Torres 2004**).
- c. Las muestras fueron trasladadas a los laboratorios académicos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Criterios de inclusión

- Frutas que presenten pudrición.
- Frutas donde se visualice alfombra de esporas.

Criterios de exclusión

- Frutas sanas y con coloración normal.
- Frutas asintomáticas.

Aislamiento de *B. cinerea*

Se siguió la metodología presentada por **Pincay et al. (2020)** y **Acosta et al. (2021)** con modificaciones:

- a. Los frutos con presencia de moho gris fueron incubados a 25°C por dos días con el fin de favorecer la esporulación.
- b. Se tomaron muestras de esporas.
- c. Se cultivaron estas muestras en cajas Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) con gentamicina (0,05%).
- d. Se incubaron las cajas a 25°C durante tres días.
- e. Se observó la presencia de micelio y se tomaron hifas para realizar subcultivos hasta esporulación.

Purificación de *Botrytis cinerea*

Se llevó a cabo un cultivo monospórico según **Pérez et al. (2020)**:

- a. Se realizaron diluciones 1/1.000 a 1/10.000 p/v mediante barrido en placa con Agar Agua (AA) durante 24 h.
- b. Se transfirieron las esporas individuales a placas con Agar Malta (AM) para asegurar la viabilidad celular.

Identificación macroscópica de *B. cinerea*

- a. Se observaron las características distintivas de *B. cinerea* como la forma y coloración del micelio siendo este gris claro; conidios apareciendo como estructuras

esféricas de coloración oscura y esclerocios con coloración grisácea oscura (Pei et al. 2019).

Identificación microscópica de *B. cinerea*

- a. Se observaron las muestras mediante preparación con cinta adhesiva donde se apoyó un trozo de esta sobre la superficie de la colonia.
- b. Se colocó una gota de azul de lactofenol y se llevó a un portaobjetos y este a su vez al microscopio.
- c. Fue posible identificar esclerocios, los cuales se presentaron estructuras irregulares, planas, duras y de coloración negra; conidios que se presentaron a manera de estructuras alargadas y ramificadas con coloración leve y forma esférica (Pei et al. 2019).

Identificación molecular de *B. cinerea*

Extracción de ADN

El ADN fue extraído mediante el uso de Thermo Scientific™ kit de purificación de ADN genómico GeneJET siguiendo las especificaciones del fabricante. El análisis PCR se llevó a cabo mediante el uso de un primer C729 específico para la identificación de *B. cinerea*.

Tabla 4. *Primer a usar en la identificación de *B. cinerea**

Primer	Secuencia (5'→3') C729	Amplicón (pb)
Sentido	AGCTCGAGAGAGATCTCTGA	241
Antisentido	CTGCAATGTTCTGCGTGGAA	

Fuente: (Rigotti, Viret, and Gindro 2006)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se llevó a cabo el protocolo propuesto por **Juárez et al. (2012)** con modificaciones:

- a. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 12.5 μL Dreamtaq Green PCR Master Mix Thermo Scientific en un volumen final de 25 μL compuesto por 0.5 μL de cebadores 10 μM ; 9.5 μL agua libre de nucleasas y 2 μL de ADN de concentración 25 ng/ μL , tampón de reacción 1X (Tris-HCl 75 mM, pH 8,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM, Tween 20 al 0,01 %, MgCl 2 mM) (**Moparthi et al. 2020**).
- b. Se usaron los oligonucleótidos C729f/C729r (*Tabla 4*), específicos para *B. cinerea*.
- c. En un termociclador se llevó a cabo un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min; 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 20 segundos; temperatura de alineamiento de los cebadores de 50-56°C durante 20 segundos y una temperatura de extensión de 72°C durante 30 segundos con una extensión final de 72°C durante 5 minutos (**Rigotti et al. 2006**).
- d. Se llevó el resultado de la PCR a electroforesis para observar los fragmentos en gel de agarosa 1.4% usando buffer TRIS-acetato-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA TAE), visualizado gracias a la luz UV mediante tinción con bromuro de etidio (**Pei et al. 2019**).
- e. El control positivo fue obtenido de la empresa BioSin.

Microencapsulación de conidios de *T. harzianum*

Obtención de la materia prima

Se usó *T. harzianum* de la casa comercial AGEARTH como Biotrich.

Preparación de la muestra

Se efectuó la metodología propuesta por **Jin and Custis (2011)** con modificaciones:

- a. Se activó la cepa mediante las instrucciones dadas por el fabricante.

- b. Se inoculó la cepa en agar PDA y se incubó a 28°C hasta que las colonias presenten esporulación densa.
- c. Se transfirieron a placas con PDA, discos de 1 cm de diámetro cortados desde el centro de la colonia hasta el borde con el fin de prolongar la recuperación del vigor de crecimiento.
- d. Se incubaron las cepas y se les proporcionó luz con el propósito de aumentar el porcentaje de conidios.

Producción de conidios

Se llevó a cabo una producción de conidios por fermentación sólida según **Jin and Custis, (2011)** con modificaciones:

- a. Se lavó 500 g de arroz con agua de la llave durante tres repeticiones.
- b. Se dejó hidratar el arroz durante 60 min y se eliminó el exceso de agua.
- c. Se colocó 100 g de arroz en cinco bolsas, se cerraron eliminando el aire y realizando un nudo.
- d. Se llevaron a esterilizar en autoclave.
- e. Se realizó una suspensión de conidios preparada mediante la adición de 20 ml de agua destilada y Tween 20 (0.1%) a un placa que posea *T. harzianum* desprendiendo las estructuras con una aguja de disección estéril.
- f. Se añadió 125 ppm de gentamicina.
- g. Se tomó 2 ml de la suspensión preparada y se inoculó en la bolsa con el sustrato estéril en condiciones del mismo tipo.
- h. Se cerraron y etiquetaron las bolsas.
- i. Se incubaron a temperatura ambiente hasta observar esporulación y formación de micelio.
- j. Se realizó la cosecha en condiciones estériles mediante la adición de 1.4 L de agua destilada estéril a cada bolsa.

- k. Se lavaron los conidios y la suspensión fue tamizada mediante un tamiz de malla y fue recogida en botellas estériles.
- l. La suspensión fue centrifugada a 10.000 rpm por 5 min y se recogió la pasta conidial para la microencapsulación.

Microencapsulación de *T. harzianum* mediante secado por aspersión

De acuerdo con el estudio de **Muñoz-Celaya et al. (2012)** se realizó el siguiente protocolo de microencapsulación mediante secado por aspersión cuyos resultados fueron los más favorables:

- a. Se llevó a cabo una solución acuosa de (20% p/v) de goma arábiga, maltodextrina y una suspensión de conidios al 1% (p/v) en tampón fosfato 50mM (pH 5,6) y se mezclaron 500 ml.
- b. La microencapsulación fue realizada mediante el equipo Mini Spray Dryer de Buchi-B290, cuyo caudal de aspirador fue del 100%.
- c. La suspensión de 500 ml fue alimentada y la temperatura de entrada será de 150°C mientras que la de salida de 90°C.
- d. Las microcápsulas fueron recogidas una vez finalizó el proceso y llevadas al refrigerador para su preservación.

Microencapsulación de *T. harzianum* mediante gelificación iónica

Se siguió el protocolo descrito por **Rodrigues et al. (2020)** con modificaciones:

- a. Se preparó una solución de alginato al 2% y se agregaron los conidios (2% p: v), obteniendo una solución 1:1 v: v.
- b. Se agitó la solución hasta obtener una mezcla homogénea.
- c. Se agregó la mezcla en una solución 0.1 M de CaCl₂, agitando con la ayuda de un agitador magnético.
- d. Se almacenó las microcápsulas a 4°C.

Demostración de la actividad antagónica de microcápsulas de *T. harzianum* frente a *B. cinerea*

Prueba *in vitro* del antagonismo entre *B. cinerea* y *T. harzianum*.

- a. Se colocaron discos de 5 mm de diámetro de micelio de *B. cinerea* a un extremo de la caja Petri con medio PDA con gentamicina (0,05%).
- b. Se incubaron las cajas a 26°C durante 3 días.
- c. Se colocaron microcápsulas de *T. harzianum* al extremo contrario de la caja Petri.
- d. Se incubaron las cajas a 26°C durante 7 días sin luz.

Cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

Se tomó en cuenta el radio de crecimiento del patógeno (RCP), el radio de crecimiento del antagonista (RCA) donde el porcentaje de inhibición de crecimiento radial estuvo dado por la siguiente fórmula:

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} 100$$

Donde:

R1: radio del patógeno testigo

R2: radio del patógeno en
enfrentamiento

(Ezziyyani et al. 2004)

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un diseño factorial A x B, donde A fue el tipo de microencapsulación (secado por aspersión y por gelificación iónica), mientras que B correspondió a los días de incubación (1, 2 y 3 días). La variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición de crecimiento radial. El análisis de datos se realizó con el software IBM SPSS Statics 25, aplicando una prueba de Tukey al 5%, de tal manera que se pudieran determinar similitudes significativas entre los datos.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.1.1 Aislamiento e identificación de *B. cinerea*

En los frutos seleccionados se observó síntomas asociados a la podredumbre gris (*Anexo 2*). **Isaza, Zuluaga, and Marulanda (2019)** afirman que las frutas recolectadas deben presentar esporulación abundante lo que indica una colonización por parte del patógeno y se asocia a una mejor toma de muestras y propagación del inóculo.

Una identificación previa fue realizada mediante la técnica de microcultivo con el fin de suponer microscópicamente que el microorganismo presente se tratase de *B. cinerea*; esta técnica se llevó a cabo mediante el uso de un portaobjetos cubierto por PDA a un extremo y colocado en una cámara de crecimiento que contiene papel filtro húmedo (*Figura 7A*), sin embargo, **Jurado et al. (2021)** señalan la utilización de agar Sabouraud para llevar a cabo el microcultivo ya que por su composición y mayor acidez inhibe naturalmente la proliferación de bacterias.

Quesnel, (1969), afirma que en el proceso de película húmeda existe un vasto espacio para que el microorganismo se desarrolle y pueda ser visualizado adecuadamente mediante el uso del microscopio óptico (*Figura 7B*), además de evitar el desperdicio de grandes cantidades de medio de cultivo. **Bénére et al. (2007)** indica que bajo el mismo objetivo es posible usar la técnica de microcultivo mediante sellado en placa, sin embargo, existen ciertas limitaciones en cuanto a las condiciones de oxígeno que el hongo requiere.

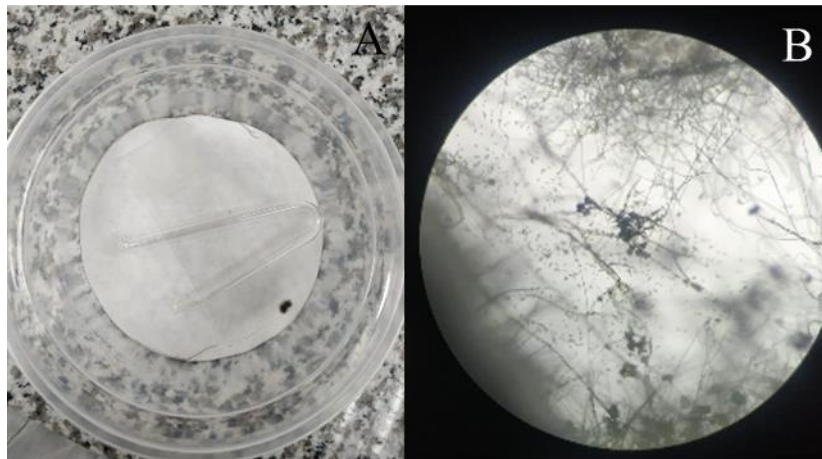


Figura 7. Método de microcultivo. A) Elementos del microcultivo. B) Muestra asociada a *B. cinerea* observada mediante lente de 10X.


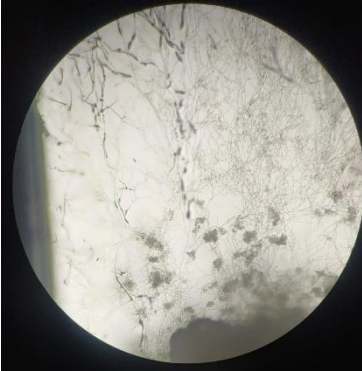
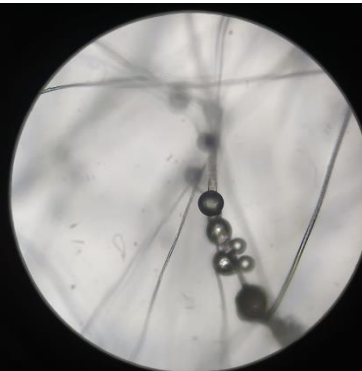
Al tratarse de una muestra ambiental, se manifiesta la presencia de múltiples microorganismos; la corporación colombiana de investigación agropecuaria (AGROSAVIA 1999) indica que además de *B. cinerea* existen diversos patógenos relacionados a enfermedades de la mora dentro de los que destacan *Candida sp.*, *Geotrichum sp.*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium spp.* y *Fusarium sp.* Una vez estos han sido cultivados, fueron identificados microscópicamente a través de características morfológicas representativas como se dispone en la *Tabla 5*.

Debido a sus características fenotípicas, fue posible suponer la existencia de *Rhizopus sp* y *Fusarium sp* en los aislamientos de las bayas seleccionadas. Este último es el agente causal del moho rosado; *Fusarium sp* se caracteriza por presentar micelio blanquecino con ligera pigmentación rosa. Sin embargo, microscópicamente se pueden apreciar clamidosporas, macro y microconidios, siendo los macroconidios estructuras típicas de este patógeno por su curvatura y alargamiento a manera de canoa (*Figura 9*) (Leslie and Summerell 2008).

Por otro lado, *Rizhopus sp.* produce pudrición blanda y puede ser confundido con la patología generada por *B. cinerea* (*Figura 8*) debido a la coloración blanquecina de su estado temprano. Sin embargo **Jenessen et al. (2008)** indican que al crecer,

las hifas presentan esporas oscuras, esporangióforos filamentosos con esporangios negros, propios de este hongo como se puede apreciar en la *Figura 10*.

Tabla 5. Principales estructuras encontradas en el cultivo primario, descritas a partir de las claves de *Barnett and Hunter (1998)*

Muestra	Descripción	Posible patógeno
	<p><i>Figura 8.</i> Conidióforos alargados, con ramificaciones irregulares y racimos de conidios al extremo.</p>	<p><i>Botrytis</i></p>
	<p><i>Figura 9.</i> Conidios en forma de canoa, dispuestos en tres o más celdas</p>	<p><i>Fusarium</i></p>
	<p><i>Figura 10.</i> Conidios globosos, nacen de esporangióforos.</p>	<p><i>Rizhopus</i></p>

Una vez identificada *B. cinerea* en base a características microscópicas ópticas a partir de tinción con azul de lactofenol (*Figura 11*) asociadas a las claves de **Barnett and Hunter, (1998)**, se procedió a la purificación. Aquí se describen

conidióforos ramificados con presencia de conidios circulares en sus extremos, los conidióforos asemejan a un racimo de uvas (**Isaza et al. 2019**).

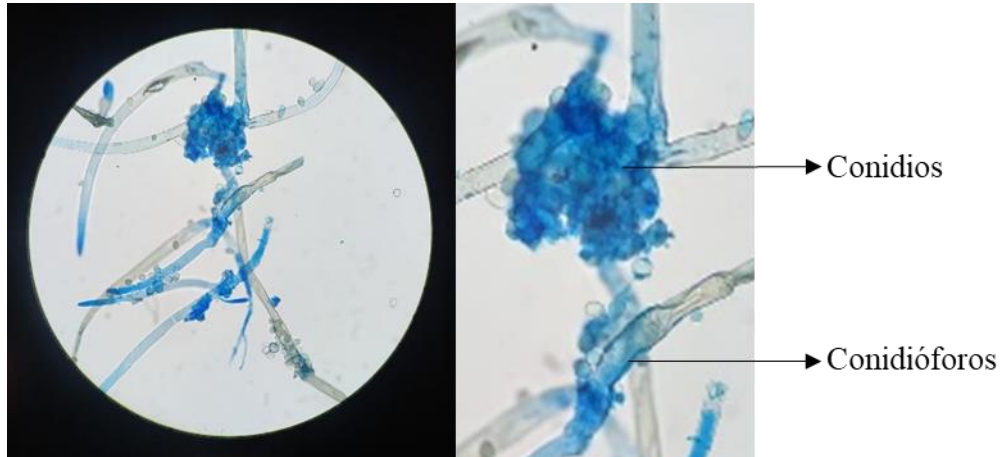


Figura 11. Observación de *B. cinerea* a través del microscopio óptico con lente 40X, se identifican estructuras características como conidióforos con conidios agrupados en racimo.

Los aislados presentaron micelio blanquecino abundante con tendencia grisácea sin presencia de esclerocios y de textura algodonosa. **Pei et al. (2019)** indican que estas características corresponden a aislamientos miceliales, propios de condiciones de baja humedad en donde los esclerocios son poco apreciables o hialinos, además de presentar un cultivo de poca madurez (*Figura 12*).

Por otro lado, **Isaza et al. (2019)**, indican que *B. cinerea* posee gran variabilidad en su morfología, sin embargo, se caracteriza por una esporulación densa con un crecimiento micelial extenso. Se observó un solo tipo de crecimiento micelial de tipo algodonoso correspondientes a condiciones de incubación de 25°C y una humedad relativa de aproximadamente 95-98 %.

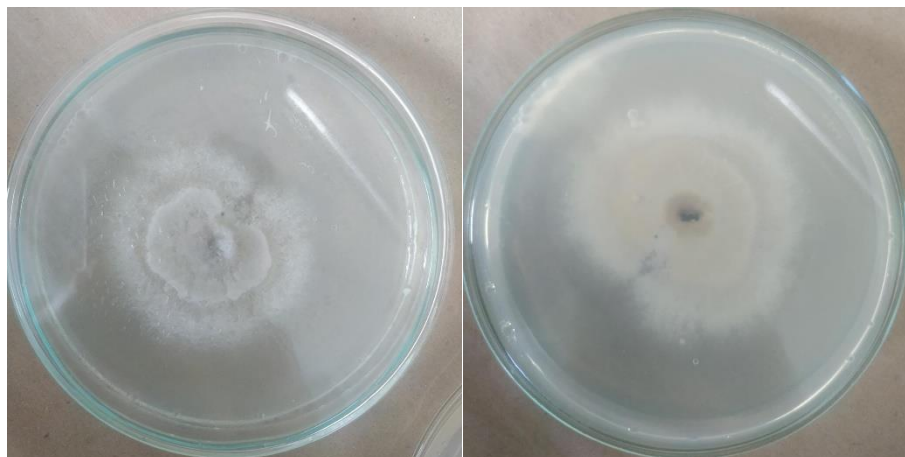


Figura 12. Cultivo puro de *Botrytis cinerea*.

Se llevó a cabo la extracción del ADN fúngico mediante el uso de un kit comercial Thermo Scientific™ kit de purificación de ADN genómico GeneJET siguiendo las especificaciones del fabricante. **Abdel-Latif and Osman (2017)** indica que el uso del método estándar de extracción es más eficiente en cuanto a la obtención de ácidos nucleicos, sin embargo el tiempo que toma es mayor a comparación del llevado a cabo mediante kit comercial.

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada gracias al uso de oligonucleótidos C729f/C729r, específicos para el patógeno (*Tabla 4*) los cuales fueron diseñados a partir de RAPDs, es decir, mediante amplificación aleatoria de ADN polimórfico. Se realizaron dos cargas de 3 µl de muestra, cada una en gel de agarosa al 1 %, se registraron bandas coincidentes con los oligonucleótidos entre 700 a 800 pb, por lo que se confirma la presencia de *B. cinerea* en los aislados (*Figura 13*).

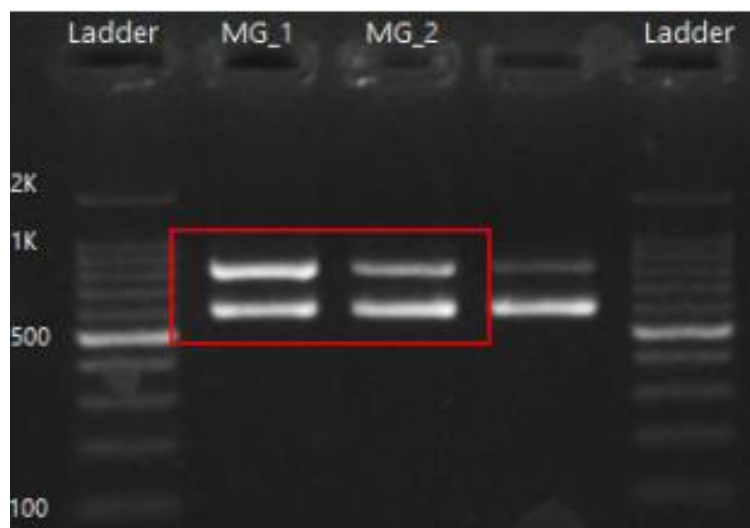


Figura 13. Electroforesis asociada a la identificación de *Botrytis cinerea*

3.1.2 Producción de conidios de *T. harzianum*

Los conidios son esporas asexuales que permiten la generación, propagación y dispersión del microorganismo ya que soportan condiciones desfavorables a diferencia de las hifas (Muñoz-Celaya et al. 2012). Estas estructuras llevan a cabo una reproducción más rápida a comparación de la sexual ya que no intervienen gametos.

Se llevó a cabo un proceso de fermentación sólida mediante el uso de arroz como sustrato (Figura 14A) y un inóculo de *T. harzianum* obtenido a partir de la activación y subcultivo de este hongo en PDA. Lewis and Papavizas (1983) en un estudio indican que en sustrato sólido se forman 10 veces más conidios que mediante fermentación líquida. Según Torres et al. (2017) a través de este proceso fermentativo se obtienen conidios más tolerantes a condiciones de estrés, además de que se aprovecha un sustrato económico y de fácil acceso, sin embargo, Agamez Ramos et al. (2008) con este propósito proponen el uso de residuos agrícolas altos en celulosa como el caso de la cascarilla de arroz y de algodón.

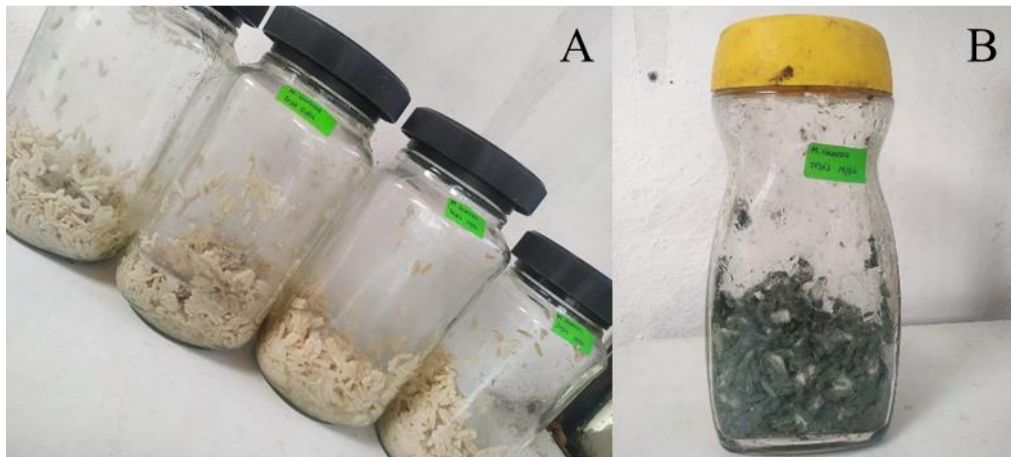


Figura 14. A) Fermentación sólida de *T. harzianum* empleando arroz como sustrato. B) Colonización de *T. harzianum* en el medio

La biomasa conidial obtenida a partir de fermentación sólida (Tabla 6) fue de 4,7059 g de biomasa por cada 100 g de sustrato después de la segunda semana de incubación, el arroz es un sustrato rico en almidón y celulosa, ideal para crecimiento fúngico. **Mulatu et al. (2021)** afirma que la mezcla de salvado de trigo con arroz blanco favorece un rendimiento máximo de crecimiento de *Trichoderma spp.* y producción de conidios.

En las muestras 6, 7 y 10 existen valores menores a 0,5 g, este suceso se asocia a posible presencia de bacterias u otros hongos durante la inoculación de *T. harzianum*. **Gato (2010)** afirma que durante la activación y subcultivo del producto comercial existe posibilidad de contaminación microbiana dentro del proceso por un manejo ineficiente de las técnicas de cultivo.

Iqbal, Ashfaq, and Malik (2017) recomiendan el uso de antibióticos de amplio espectro durante el proceso de transferencia de conidios o estructuras reproductivas, con el fin de evitar contaminación por bacterias. En este estudio, se empleó gentamicina, un aminoglucósido de amplio espectro que interviene en la síntesis proteica provocando la muerte microbiana (**Yoshizawa, Fourmy, and Puglisi 1998**).

Las muestras 1, 2 y 3 mostraron una mejor producción de masa conidial, valores relacionados a una mejor exposición a la luz durante el proceso fermentativo, siendo un factor importante dentro del desarrollo conidial. **Daryaei et al. (2016)** dentro de su investigación señalan que la exposición a la luz incrementa el número de conidios en comparación a aquellos tratamientos que carecen de iluminación debido a que ciertas especies de *Trichoderma son* fotoblásticas positivas.

Tabla 6. Biomasa conidial obtenida

Muestra	Cantidad de sustrato (g)	Masa conidial (g)
1		8,406
2		9,567
3		8,244
4		4,307
5		5,509
6	100	0,003
7		0,006
8		7,806
9		3,209
10		0,002
	Promedio	4,7059

3.1.3 Microencapsulación de conidios

El proceso de secado por aspersión fue llevado a cabo a una temperatura de entrada de 150°C y salida del 90°C. Se obtuvo un rendimiento del 30 % del microencapsulado con respecto a la solución inicial (*Anexo 6*), este porcentaje se asocia a pérdidas durante el proceso de secado. Una de las causas es el proceso de homogeneización de la muestra, el cual se ve afectado por la fuerza de cizallamiento, esta es capaz de romper las células e interferir en su viabilidad (**Muñoz-Celaya et al. 2012**). Por otra parte, el tamaño de los conidios de *T. harzianum* se encuentran dentro de un rango de 3,8 a 4 µm (**Romero-Arenas et al. 2009**) lo que puede causar que la tobera se bloquee, la temperatura de salida

aumente y sea necesario la limpieza de la máquina, causando pérdidas en el microencapsulado (BÜCHI Labortechnik AG 2020).

Dentro de los materiales de pared usados se encuentran la maltodextrina (MD) y la goma arábiga (GA) en conjunto. Estos componentes aportan baja viscosidad, alta solubilidad, así como estabilidad en el caso de emulsiones (Karaaslan et al. 2021). En el presente estudio se llevó a cabo una relación 3:1 (MD:GA) con una concentración de conidios del 2 % (Tabla 7); esta proporción está asociada a la capacidad estabilizadora de la maltodextrina a la vez que reduce la aglomeración del microencapsulado durante su almacenamiento, mientras que la goma arábiga ayuda a emulsificar la solución gracias a su solubilidad (Jittanit et al. 2011). Sin embargo, Muñoz-Celaya et al. (2012), indican que una proporción de MD:GA de 1:1 presenta una mejor supervivencia por parte de los conidios debido a la formación de un recubrimiento denso y estructurado.

Tabla 7. Composición del microencapsulado realizado

Componente	Cantidad (g)
Goma arábiga	36,75
Maltodextrina	12,25
Pasta conidial	1

Por su parte, la microencapsulación mediante gelificación iónica arrojó un rendimiento del 647,142 %, (Anexo 9), este valor se asocia a que el proceso fue llevado a cabo de manera manual además de que se mantuvieron estas estructuras en la solución catiónica por lo que se asume podría existir una absorción de líquido y aumento en la masa recuperada. Ortiz-Romero et al. (2021) dentro de su estudio obtuvieron un 100,66 % de rendimiento en la microencapsulación sin agua, por lo que este solvente sería un factor de interés dentro del rendimiento del microencapsulado.

3.1.4 Antagonismo ejercido por *T. harzianum* frente a *B. cinerea*

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial

Tratamientos	Réplica	Gramos microcápsula	Radio micelial (mm)	PICR (%)	Promedio	
Control	Día 1	1	0	30	0	
	Día 2	1	0	35,5		
	Día 3	1	0	37,5		
Secado por Aspersión	Día 1	1	0,027	15	56,306	
		2	0,029	8,5	75,240	66,429
		3	0,029	10	70,871	
Gelificación iónica	Día 1	1	0,027	9,5	72,327	
		2	0,029	6	82,523	76,463
		3	0,029	8,5	75,240	
Secado por Aspersión	Día 2	1	0,027	10	70,871	
		2	0,028	8,5	75,240	73,253
		3	0,029	9	73,784	
Gelificación iónica	Día 2	1	0,027	2	94,174	
		2	0,028	2,5	92,718	87,721
		3	0,029	7,5	78,153	
Secado por Aspersión	Día 3	1	0,027	7,5	78,153	
		2	0,028	5	85,435	83,755
		3	0,029	4	88,348	
Gelificación iónica	Día 3	1	0,027	1,5	95,631	
		2	0,028	1	97,087	92,417
		3	0,029	5	85,435	

En la *Tabla 8* se evidencia que las microcápsulas generadas a partir de la técnica de secado por aspersión mostraron valores de inhibición del 66,43 % en el primer día de incubación a comparación de aquellas obtenidas mediante gelificación iónica que arrojaron un porcentaje del 76,46 %. **Jin and Custis (2011)** afirman

que los conidios de *T. harzianum* son altamente hidrofílicos, por lo que tienden a deshidratarse por la temperatura de secado. Debido a esto **Braga et al. (2019)** mencionan que el secado a temperaturas menores a 90°C acompañado del uso de trazas de sacarosa u otros materiales de protección aumentan la viabilidad celular en las microcápsulas evitando la muerte del microorganismo.

Chowdhury et al. (2023) en un estudio asociado a la actividad antagónica sobre *Sclerotium rolfii* en suelo, señalan que existe una mejor actividad antagónica de microcápsulas mediante secado por aspersión una vez se acompaña su aplicación con sustratos y sustancias orgánicas que favorezcan la proliferación y crecimiento de *T. harzianum*, por lo que a este proceso se le asocia un porcentaje de inhibición de crecimiento del patógeno del 63,17 %.

Durante el segundo día de incubación existió una mayor inhibición por parte de ambos tratamientos, sin embargo, la gelificación iónica sigue destacando con un 87,72 % sobre el 73,25 % del secado por aspersión. Esto se ve relacionado a la capacidad del alginato de promover la actividad enzimática de *T. harzianum* debido a la interacción y aprovechamiento del polímero una vez la microcápsula se encuentre aplicada (**Rodrigues et al. 2020**). El alginato de sodio por su naturaleza es una fuente alta en carbohidratos lo que lo convierte en una sustancia biocompatible y degradable por el hongo. Es necesario mencionar que al haber sido llevado a cabo el proceso de gelificación manualmente, el tamaño de las partículas obtenidas mediante este proceso son mayores; **Ortiz-Romero et al. (2021)** señalan que esta característica brinda un efecto protector mayor e influye dentro del crecimiento fúngico.

En el tercer día de incubación se presentó un PICR de 83,76 % para secado por aspersión y 92,417 % para gelificación iónica, estos valores permiten señalar la importancia del tiempo en la colonización y nutrición por parte del biocontrolador, **Perez et al. (2018)** indican que el tiempo de permanencia de *T. harzianum* incide en la reducción del índice de infección, así como el aumento en la eficacia del mismo.

De acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk (*Tablas 9 y 10*) se evidencia que los datos están distribuidos normalmente para el tipo de microencapsulación empleado (Estadísticos 0,324 y 0,468; $p > 0,05$), así como para los días de incubación (0,301; 0,116 y 0,614; $p > 0,05$), existe equivalencia entre grupos así como observaciones independientes.

Tabla 9. Pruebas de normalidad datos de PICR de acuerdo con el tipo de microencapsulación con un nivel de significancia del 5%.

	Tipo de Microencapsulación	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
PICR	Gelificación iónica	,210	9	,200*	,911	9	,324
(%)	Secado por aspersión	,220	9	,200*	,929	9	,468

Tabla 10. Pruebas de normalidad datos de PICR de acuerdo con los días de incubación con un nivel de significancia del 5%.

	Días de incubación	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
PICR (%)	Día 1	,278	6	,163	,887	6	,301
	Día 2	,271	6	,191	,834	6	,116
	Día 3	,182	6	,200*	,934	6	,614

En la *Tabla 11* es posible identificar por su nivel de significancia menor a 0,05 que tanto los tipos de microencapsulación como los días de incubación mantienen diferencias significativas con respecto al porcentaje de inhibición de crecimiento radial, es decir, estos factores inciden dentro de los valores que este porcentaje arroja; se acepta la hipótesis alternativa.

Tabla 11. Pruebas de efectos inter-sujetos

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1376,929 ^a	5	275,386	5,961	,005
Intersección	116409,333	1	116409,333	2519,891	,000
Tratamientos	544,926	1	544,926	11,796	,005
Tiempo	794,998	2	397,499	8,605	,005
Tratamientos * Tiempo	37,004	2	18,502	,401	,679
Error	554,354	12	46,196		
Total	118340,615	18			
Total corregido	1931,283	17			

a. R al cuadrado = ,713 (R al cuadrado ajustada = ,593)

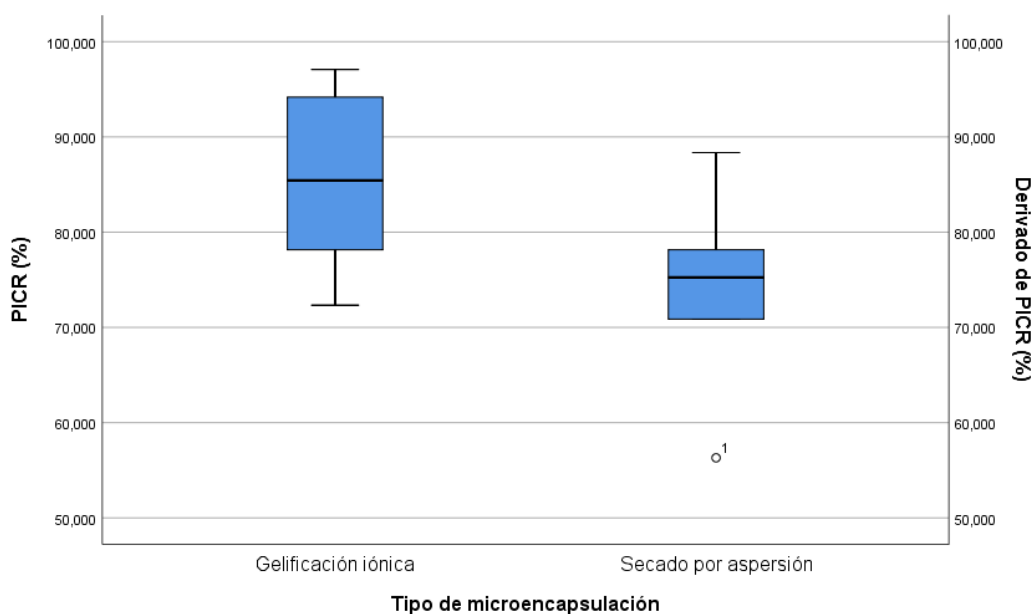


Figura 15. Diagrama de cajas donde se evalúan los tipos de microencapsulación con respecto al PICR

A través de la *Figura 15* es posible apreciar que el mejor tratamiento en cuanto a tipo de microencapsulación se refiere está dado por la gelificación iónica, los datos que este factor arrojan son simétricos así como una distribución normal. El secado por

aspersión incrementa sus porcentajes durante las réplicas mientras que la gelificación iónica tiende a presentar máximos y mínimos.

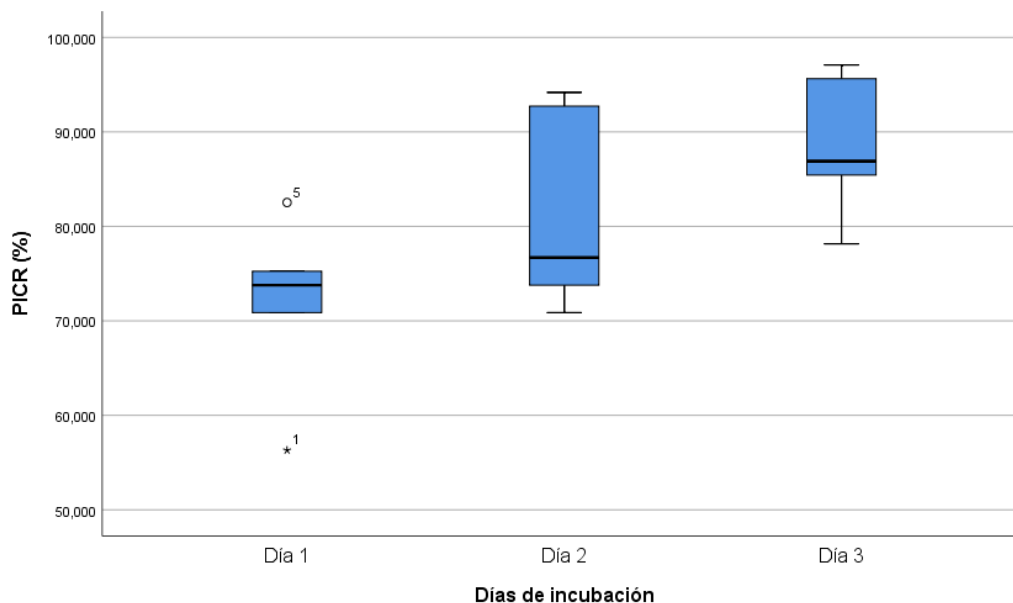


Figura 16. Diagrama de cajas donde se evalúan los días de incubación con respecto al PICR

En la *Figura 16* es posible evidenciar que en cuanto al factor días de incubación, el mejor tratamiento corresponde a los 3 días, según **Pérez et al. (2013)** describen una mejor inhibición por parte de *Trichoderma harzianum* a las 72 horas y su disminución conforme pasa el tiempo, además de la estrecha relación entre este factor y la concentración de microorganismo. Así mismo se observa que la mediana del día 2 se encuentra relacionada con el máximo PICR del día 1 como su superposición con respecto al día 3. Este último posee diferencias significativas marcadas y dadas por la prueba de Tukey donde $p < 0,05$ (*Anexo 14*). Los porcentajes medias entre días son variables entre sí así como los datos no son asimétricos.

Por otra parte, en cuanto al peso de microcápsulas empleado durante el ensayo, se utilizó por réplica la misma cantidad de microcápsulas para cada tratamiento; es posible apreciar que los mejores resultados fueron obtenidos por parte de la microencapsulación iónica a 0,028 y 0,027 g obteniendo porcentajes de 97,087 y 95,631 % respectivamente, al tercer día de incubación. De esta manera es posible

evidenciar que las microcápsulas de alginato presentan una mejor liberación del microorganismo y por ende control frente a *Botrytis cinerea*; **Qi et al. (2023)** indican que la concentración del 1 % del polímero en conjunto con iones divalentes en el proceso de microencapsulación permiten aumentar la germinación de *Trichoderma sp* y proporcionar una inhibición de alrededor de del 76% en contra de patógenos como *Oidium sp*.

3.2 Verificación de hipótesis

$H_0 \neq 0$ Se rechaza la hipótesis nula.

$H_a = 0$ Se acepta la hipótesis alternativa, se concluye que el tipo de microencapsulación de conidios de *T. harzianum* así como el tiempo de incubación influyen en la inhibición del crecimiento de *B. cinerea*.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se evaluó la capacidad antagónica de los *Trichoderma harzianum* microencapsulado y su relación con el tiempo de incubación mediante el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) presentando los mejores resultado a los tres días de incubación con una media del 92,417% para la gelificación iónica y 83,755% para el secado por aspersión.
- Se confirmó la presencia de *Botrytis cinerea* en muestras de mora mediante el uso de técnicas macro y microscópicas así como la reacción en cadena de la polimerasa mediada por oligonucleótidos específicos para el patógeno mostrando bandas coincidentes a los 700-800 pb.
- De los microencapsulados obtenidos través de secado por aspersión usando maltodextrina y goma arábica como materiales de pared se obtuvo un rendimiento del 30% debido a pérdidas ocasionadas por la temperatura de secado, mientras que la gelificación iónica con alginato de sodio y cloruro de calcio arrojó un rendimiento del 647,142 %.
- Conforme los microencapsulados obtenidos se evidenciaron mejores resultados en microcápsulas de alginato de sodio por su alto contenido de carbohidratos que permite la nutrición de *T. harzianum* influyendo en su crecimiento como en el PICR.

4.2 Recomendaciones

- Realizar análisis de vida útil para ambos tipos de microencapsulación y determinar la viabilidad de los conidios microencapsulados con respecto al tiempo así como la influencia en el porcentaje de inhibición de crecimiento radial.
- Utilizar secuenciación genómica a través de métodos enzimáticos como Sanger o secuenciación automática con el fin de corroborar la identidad de *Botrytis cinerea*.
- Llevar a cabo pruebas de caracterización de las microcápsulas con el fin de reconocer su morfología, asegurar la presencia del microorganismo así como evidenciar la eficiencia cualitativa de la microencapsulación.

MATERIAL DE REFERENCIA

- Abbey, Joel A., David Percival, Lord Abbey, Samuel K. Asiedu, Balakrishnan Prithiviraj, and Annemiek Schilder. 2019. "Biofungicides as Alternative to Synthetic Fungicide Control of Grey Mould (*Botrytis Cinerea*)—Prospects and Challenges." *Biocontrol Science and Technology* 29(3):241–62. doi: 10.1080/09583157.2018.1548574.
- Abdel-Latif, Amani, and Gamal Osman. 2017. "Comparison of Three Genomic DNA Extraction Methods to Obtain High DNA Quality from Maize." *Plant Methods* 13(1):1–9. doi: 10.1186/s13007-016-0152-4.
- Acosta, Luis T., Deysi K. Azania, and Rolando Azania. 2021. "Cultivo Dual in Vitro de Cepas Nativas de *Trichoderma Spp.* Frente a *Botrytis Sp.* Patógeno de *Passiflora Ligularis Juss.*" *Revista de Investigación Agropecuaria Science and Biotechnology* 1(4):43. doi: 10.25127/riagrop.20214.720.
- Agamez Ramos, Elkin Yabid, Raúl Ignacio Zapata Navarro, Luis Eliécer Oviedo Zumaqué, and José Luis Barrera Violeth. 2008. "Evaluación de Sustratos y Procesos de Fermentación Sólida Para La Producción de Esporas de *Trichoderma Sp.*" *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(2):23–34.
- AGROSAVIA, Corporación colombiana de investigación agropecuaria. 1999. *Principales Enfermedades en Postcosecha Mora (Rubus Glaucus Benth).*
- Barnett, H., and B. Hunter. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed. Minnesota: American Phytopathological Society.
- Bénére, Ely, Raquel Andreia Inocêncio da Luz, Marieke Vermeersch, Paul Cos, and Louis Maes. 2007. "A New Quantitative in Vitro Microculture Method for *Giardia Duodenalis* Trophozoites." *Journal of Microbiological Methods* 71(2):101–6. doi: 10.1016/j.mimet.2007.07.014.
- Braga, Alinne B. A. C., Cleiver J. M. Costa, Alan W. V. Pomella, Eloízio J. Ribeiro, Líbia D. Santos, and Marta F. Zotarelli. 2019. "Evaluation of Lethality Temperature and Use of Different Wall Materials in the Microencapsulation Process of *Trichoderma Asperellum* Conidias by Spray Drying." *Powder*

- Technology* 347:199–206. doi: 10.1016/j.powtec.2019.02.037.
- BÜCHI Labortechnik AG. 2020. “B-290 Mini Spray Dryer: Manual de Instrucciones.”
- Chowdhury, Md Rizvi, Sheikh Faruk Ahmed, Bareerah Khalid, Zannatul Ferdaous Bony, Jannatul Ferdoushi Asha, and Md Khurshed Alam Bhuiyan. 2023. “Biocontrol Efficiency of Microencapsulated *Trichoderma Harzianum* Coupled with Organic Additives against Potato Stem Rot Caused by *Sclerotium Rolfsii*.” *Plant Stress* 9(February):100181. doi: 10.1016/j.stress.2023.100181.
- Cortés-Camargo, Stefani, Angélica Román-Guerrero, Jose Alvarez-Ramirez, Erik Alpizar-Reyes, Sandra Karina Velázquez-Gutiérrez, and César Pérez-Alonso. 2023. “Microstructural Influence on Physical Properties and Release Profiles of Sesame Oil Encapsulated into Sodium Alginate-Tamarind Mucilage Hydrogel Beads.” *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 5. doi: 10.1016/j.carpta.2023.100302.
- Costa, Josep. 2004. “Reacción En Cadena de La Polimerasa (PCR) a Tiempo Real.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22(5):299–305. doi: 10.1157/13059826.
- Daryaei, A., E. E. Jones, H. Ghazalibiglar, T. R. Glare, and R. E. Falloon. 2016. “Effects of Temperature, Light and Incubation Period on Production, Germination and Bioactivity of *Trichoderma Atroviride*.” *Journal of Applied Microbiology* 120(4):999–1009. doi: 10.1111/jam.13076.
- Elad, Yigal, and Alison Stewart. 2004. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer Netherlands.
- Ezziyyani, Mohammed, Consuelo Pérez Sánchez, María Emilia Requena, Luis Rubio, and María Emilia Candela. 2004. “Biocontrol Por *Streptomyces Rochei* – Ziyani –, de La Podredumbre Del Pimiento (*Capsicum Annuum L.*) Causada Por *Phytophthora Capsici*.” *Anales de Biología* 26:69–78.
- FAO. 2023. “Alimentación y Agricultura Sostenibles.” *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura*. Retrieved April 8, 2023 (<https://www.fao.org/sustainability/es/>).

- Fedele, Giorgia, Chiara Brischetto, and Vittorio Rossi. 2020. "Biocontrol of *Botrytis Cinerea* on Grape Berries as Influenced by Temperature and Humidity." *Frontiers in Plant Science* 11(August):1–11. doi: 10.3389/fpls.2020.01232.
- Gato, Y. 2010. "Métodos de Conservación y Formulación de *Trichoderma Harzianum* Rifai." *Revista Fitosanidad* 14(3):189–95.
- Ghosh, Arpita, Aditya Mehta, and Asif M. Khan. 2018. "Metagenomic Analysis and Its Applications." *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* 1–3:184–93. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20178-7.
- Gligor, Bojkov. 2022. *Gray Mold (Botrytis Cinerea) at Vines*. Scientific Research Publishing.
- Hajek, A., and J. Eilenberg. 2004. *Natural Enemies: An Introduction to Biological Control*. 2nd ed. Cambridge .
- Hjeljord, L. G., A. Stensvand, and A. Tronsmo. 2001. "Antagonism of Nutrient-Activated Conidia of *Trichoderma Harzianum* (Atroviride) P1 against *Botrytis Cinerea*." *Phytopathology* 91(12):1172–80. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.12.1172.
- Infante, D., B. Martínez, N. González, and Y. Reyes. 2009. "Mecanismos de Acción de *Trichoderma* Frente a Hongos Fitopatógenos." *Revista de Protección Vegetal* 24(1):14–21.
- INIAP. 2014. *Mora*.
- INIAP. 2016. "El Cultivo de La Mora En El Ecuador." *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca*.
- Iqbal, Shomaila, Muhammad Ashfaq, and Aamir Humayun Malik. 2017. "Isolation , Preservation and Revival of *Trichoderma Viride* in Culture Media." *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(3):1640–46.
- Isaza, Liliana, Yenni Paola Zuluaga, and Marta Leonor Marulanda. 2019. "Morphological, Pathogenic and Genetic Diversity of *Botrytis Cinerea* Pers. in Blackberry Cultivations in Colombia." *Revista Brasileira de Fruticultura* 41(6):1–15. doi: 10.1590/0100-29452019490.

- Iza, Monica, Pablo Viteri, Milton Hinojosa, Anibal Martínez, Andrea Sotomayor Correa, and William Viera. 2020. “Diferenciación Morfológica, Fenológica y Pomológica de Cultivares Comerciales de Mora (*Rubus Glaucus Benth.*)” *Enfoque UTE* 11(2):47–57. doi: 10.29019/enfoque.v11n2.529.
- Jennessen, Jennifer, Johan Schnürer, Johan Olsson, Robert A. Samson, and Jan Dijksterhuis. 2008. *Morphological Characteristics of Sporangiospores of the Temperate Fungus Rhizopus Oligosporus Differentiate It from Other Taxa of the R. Microsporus Group*. Vol. 112.
- Jin, Xixuan, and Dan Custis. 2011. “Microencapsulating Aerial Conidia of *Trichoderma Harzianum* through Spray Drying at Elevated Temperatures.” *Biological Control* 56(2):202–8. doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.11.008.
- Jittanit, Weerachet, Maythawee Chantara-In, Tithiya Deying, and Wantanee Ratanavong. 2011. “Production of Tamarind Powder by Drum Dryer Using Maltodextrin and Arabic Gum as Adjuncts.” *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 33(1):33–41.
- Juárez, Y., J. Pacheco, R. Martínez, and L. Soto. 2012. “Detección de La Podredumbre Gris Determinada Por PCR En Viñedos de Querétaro.” *Ciencias Naturales y Exactas*.
- Jurado, Henry, Ivonne Catalina, Fajardo Argoti, John Jairo, and Parreño Salas. 2021. *Procedimientos De Laboratorio De Microbiología Zootécnica*.
- Kan, Jan A. L. Van. 2005. “Infection Strategies of *Botrytis Cinerea*.” *Acta Horticulturae* 660:77–90. doi: 10.17660/ActaHortic.2005.669.9.
- Karaaslan, Mehmet, Fatih Şengün, Ümran Cansu, Bülent Başığit, Hidayet Sağlam, and Asliye Karaaslan. 2021. “Gum Arabic/Maltodextrin Microencapsulation Confers Peroxidation Stability and Antimicrobial Ability to Pepper Seed Oil.” *Food Chemistry* 337. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2020.127748.
- Leslie, J., and B. Summerell. 2008. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell.
- Lewis, J. A., and G. C. Papavizas. 1983. “Production of Chlamydo spores and Conidia by *Trichoderma Spp* in Liquid and Solid Growth Media.” *Soil Biology and*

- Biochemistry* 15(3):351–57. doi: 10.1016/0038-0717(83)90083-4.
- Mali Snehal, D., R. Khochage Swapna, M. Nitalikar Manoj, and S. Magdum Chandrakant. 2013. “Microencapsulation: A Review.” *Research Journal of Pharmacy and Technology* 6(9):954–61.
- Marín, M., G. Rivera, K. Villalobos, and R. Orozco. 2017. “Evaluación de Hongos Antagonistas de *Botrytis Cinerea* Pers., En Plantaciones de Mora, Costa Rica.” *Agronomía Costarricense* 41(1). doi: 10.15517/RAC.V41I1.29737.
- Mesa, Ana María, Duber Alexander Marín, and Jaime Calle. 2020. “Metabolitos Secundarios En *Trichoderma Spp.* y Sus Aplicaciones Biotecnológicas Agrícolas.” *Actualidades Biológicas* 41(111):1–13. doi: 10.17533/udea.acbi.v41n111a02.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. 2014. “Zonificación Agroecológica Económica Del Cultivo de Mora.”
- Molina, G., C. La Rotta, and E. Torres. 2004. “Incidencia de Infecciones Quiescentes de *Botrytis Cinerea* En Flores y Frutos de Mora de Castilla (*Rubus Glaucus Benth.*)”
- Montoya, C., L. Hincapié, and V. Uribe. 1997. “Principales Enfermedades y Plagas En El Cultivo de La Mora.” *Instituto Colombiano Agropecuario* 20 páginas.
- Moparthi, Swarnalatha, Cecilia Peluola, Bright Agindotan, Kevin McPhee, and Mary Burrows. 2020. “First Report of Gray Mold of Chickpea Caused by *Botrytis Euroamericana* in the USA.” *Crop Protection* 137:105297. doi: 10.1016/j.cropro.2020.105297.
- Mulatu, Afrasa, Tesfaye Alemu, Negussie Megersa, and Ramesh R. Vetukuri. 2021. “Optimization of Culture Conditions and Production of Bio-Fungicides from *Trichoderma* Species under Solid-State Fermentation Using Mathematical Modeling.” *Microorganisms* 9(8). doi: 10.3390/microorganisms9081675.
- Muñoz-Celaya, Ana Laura, Myriam Ortiz-García, Eduardo Jaime Vernon-Carter, Juan Jauregui-Rincón, Enrique Galindo, and Leobardo Serrano-Carreón. 2012. “Spray-Drying Microencapsulation of *Trichoderma Harzianum* Conidias in

- Carbohydrate Polymers Matrices.” *Carbohydrate Polymers* 88(4):1141–48. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.12.030.
- Nair, N. G., and R. N. Allen. 1993. “Infection of Grape Flowers and Berries by *Botrytis Cinerea* as a Function of Time and Temperature.” *Mycological Research* 97(8):1012–14. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80871-X.
- Ortiz-Romero, Nallely, Luz Araceli Ochoa-Martínez, Silvia Marina González-Herrera, Olga Miriam Rutiaga-Quiñones, and José Alberto Gallegos-Infante. 2021. “Avances En Las Investigaciones Sobre La Encapsulación Mediante Gelación Iónica: Una Revisión Sistemática.” *Tecnológicas* 24(52):e1962. doi: 10.22430/22565337.1962.
- Panizo, María Mercedes, and Xiomara Moreno. 2022. “Laboratory Identification of Fungal Infections.” *Encyclopedia of Infection and Immunity* 4:34–62. doi: 10.1016/B978-0-12-818731-9.00152-X.
- Pei, Yan Gang, Qin Jun Tao, Xiao Juan Zheng, Ying Li, Xiao Fang Sun, Zhi Fei Li, Xiao Bo Qi, Jing Xu, Min Zhang, Hua Bao Chen, Xiao Li Chang, Hui Min Tang, Li Yun Sui, and Guo Shu Gong. 2019. “Phenotypic and Genetic Characterization of *Botrytis Cinerea* Population from Kiwifruit in Sichuan Province, China.” *Plant Disease* 103(4):748–58. doi: 10.1094/PDIS-04-18-0707-RE.
- Pérez, A. A., M. A. Pérez, B. Martínez Coca, I. N. Rollhaiser, and M. C. Blengini. 2020. “Selection of *Trichoderma Spp.* Isolates in Vitro as Potential Biofungicides for the Control of *Rhizoctonia Solani Kühn* on Potato.” *AgriScientia* 37(2):21–33. doi: 10.31047/1668.298x.v37.n2.29419.
- Pérez, E., A. Bernal, P. Milanés, M. Leiva, E. Lopes, Y. Sierra, and R. Cupull. 2013. “Influencia Del Tiempo de Incubación de *Trichoderma Harzianum Rifai* En La Actividad Antifúngica Del Filtrado de Cultivo Contra *Bipolaris Oryzae*.” 40(2):25–30.
- Perez, E., A. Bernal, P. Miranés, Y. Sierra, M. Leiva, and O. Monteagudo. 2018. “Eficiencia de *Trichoderma Harzianum* (CEPA A-34) y Sus Filtrados En El Control de Tres Enfermedades Fúngicas Foliares En Arroz.” *Bioagro* 30(1):17–26.

- Petrasch, Stefan, Steven J. Knapp, Jan A. L. van Kan, and Barbara Blanco-Ulate. 2019. “Grey Mould of Strawberry, a Devastating Disease Caused by the Ubiquitous Necrotrophic Fungal Pathogen *Botrytis Cinerea*.” *Molecular Plant Pathology* 20(6):877–92. doi: 10.1111/mpp.12794.
- Petrasch, Stefan, Christian J. Silva, Saskia D. Mesquida-Pesci, Karina Gallegos, Casper van den Abeele, Victor Papin, Francisco J. Fernandez-Acero, Steven J. Knapp, and Barbara Blanco-Ulate. 2019. “Infection Strategies Deployed by *Botrytis Cinerea*, *Fusarium Acuminatum*, and *Rhizopus Stolonifer* as a Function of Tomato Fruit Ripening Stage.” *Frontiers in Plant Science* 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00223.
- Pincay, Ana, William Viera, and Antonio León. 2020. “Evaluación in Vitro Del Potencial Antagonista de *Trichoderma* sp. y Hongos Endófitos de Mora (*Rubus Glaucus* Benth) Para El Control de *Botrytis Cinerea*.” 6:109–24.
- Qi, Qi, Chengcheng Fan, Hongqu Wu, Lili Sun, and Chuanwang Cao. 2023. “Preparation of *Trichoderma Asperellum* Microcapsules and Biocontrol of Cucumber Powdery Mildew .” *Microbiology Spectrum* 11(3). doi: 10.1128/spectrum.05084-22.
- Quesnel, L. 1969. “Methods of Microculture.” *Methods in Microbiology* 1:365–425.
- Rigotti, S., O. Viret, and K. Gindro. 2006. “Two New Primers Highly Specific for the Detection of *Botrytis Cinerea* Pers. on JSTOR.” *Phytopathologia Mediterranea* 45(3).
- Rodrigues, C., N. Bilesky, R. de Lima, and L. Fernandes. 2020. “Encapsulation of *Trichoderma Harzianum* Preserves Enzymatic Activity and Enhances the Potential for Biological Control.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8(March):1–14. doi: 10.3389/fbioe.2020.00225.
- Romero-Arenas, Omar, Manuel Huerta Lara, Damián Huato, Miguel Angel, Francisco Domínguez Hernández, and Daniel Alfonso Arellano Victoria. 2009. “Características de *Trichoderma Harzianum*, Como Agente Limitante En El Cultivo de Hongos Comestibles.” *Revista Colombiana de Biotecnología* 11(2):143–51.

- Romero, Graciela, and Virginia Olivera Costa. 2016. “*Trichoderma Harzianum* Como Agente de Control Biológico - Engormix.”
- Romoleroux, Katya, Esteban Bastidas, and David Espinel. 2018. *Guía de MORAS Del Ecuador*.
- Saldarriaga Cardona, Alegría, Germán Franco, Cipriano Arturo Díaz Diez, and Gladis Emilia Múnera Uribe. 2017. *Manual de Campo Para Reconocimiento, Monitoreo y Manejo de Las Enfermedades de La Mora (Rubus Glaucus Benth.)*.
- Shao, Wenyong, Youfu Zhao, and Zhonghua Ma. 2021. “Advances in Understanding Fungicide Resistance in *Botrytis Cinerea* in China.” *Phytopathology* 111(3):455–63. doi: 10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA/ASSET/IMAGES/LARGE/PHYTO-07-20-0313-IAT1.JPEG.
- De Simone, Nicola, Bernardo Pace, Francesco Grieco, Michela Chimienti, Viwe Tyibilika, Vincenzo Santoro, Vittorio Capozzi, Giancarlo Colelli, Giuseppe Spano, and Pasquale Russo. 2020. “*Botrytis Cinerea* and Table Grapes: A Review of the Main Physical, Chemical, and Bio-Based Control Treatments in Post-Harvest.” *Foods* 9(9). doi: 10.3390/foods9091138.
- Torres, Lilian, Clara Martínez, Iván Rodríguez, and Esli Lobaina. 2017. “Caracterización Del Producto de La Fermentación Sólida de *Trichoderma Harzianum* R Ifai (A-34) Sobre Bagazo de Caña.” *Tecnología Química* 37(Marzo):417–32.
- Wang, Han Cheng, Li Cui Li, Bin Cai, Liu Ti Cai, Xing Jiang Chen, Zhi He Yu, and Chuan Qing Zhang. 2018. “Metabolic Phenotype Characterization of *Botrytis Cinerea*, the Causal Agent of Gray Mold.” *Frontiers in Microbiology* 9(MAR):1–9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00470.
- Yoshizawa, Satoko, Dominique Fourmy, and Joseph D. Puglisi. 1998. “Structural Origins of Gentamicin Antibiotic Action.” *EMBO Journal* 17(22):6437–48. doi: 10.1093/emboj/17.22.6437.

ANEXOS

Anexo 1. Registro único del contribuyente asociado a la compra de mora

SRI		Certificado Registro Único de Contribuyentes
Apellidos y nombres GUEVARA SALINAS WILLIAM HERNAN		Número RUC 1803654290001
Estado ACTIVO	Régimen GENERAL	Artesano No registra
Fecha de registro 06/10/2008	Fecha de actualización 20/10/2022	
Inicio de actividades 06/10/2008	Reinicio de actividades 20/10/2022	Cese de actividades 12/12/2019
Jurisdicción ZONA 3 / TUNGURAHUA / AMBATO		Obligado a llevar contabilidad NO
Tipo PERSONAS NATURALES	Agente de retención NO	Contribuyente especial NO
Domicilio tributario		
Ubicación geográfica		
Provincia: TUNGURAHUA Cantón: AMBATO Parroquia: HUACHI GRANDE		
Dirección		
Barrio: LA LIBERTAD Calle: VIA EL CARMEN Número: S/N Referencia: FRENTE A LA URBANIZACION MADRID, CASA DE UN PISO, COLOR VERDE		
Medios de contacto		
Celular: 0981344254 Email: william1982guevara@gmail.com		
Actividades económicas		
• A01240901 - OTROS CULTIVOS DE FRUTAS CON HUESO Y CON PEPA: CEREZAS, CIRUELAS, ENDRINAS, CAPULÍES, OVOS, CLAUDIAS, ETCÉTERA		
• A01240101 - CULTIVO DE MANZANAS, PERAS Y MEMBRILLOS.		
• A01250101 - CULTIVO DE BAYAS GROSELLAS, GROSELLAS ESPINOSAS, KIWIS, FRAMBUESAS, FRESAS (FRUTILLAS), MORAS, MORTIÑOS (ARÁNDANOS), UVILLA Y OTRAS BAYAS.		
Establecimientos		
Abiertos	Cerrados	
1	0	
Obligaciones tributarias		
No registra		
ⓘ Las obligaciones tributarias reflejadas en este documento están sujetas a cambios. Revise periódicamente sus obligaciones tributarias en www.sri.gob.ec .		
Números del RUC anteriores		
No registra		

1/2

www.sri.gob.ec

Anexo 2. Bayas seleccionadas para el muestreo de Botrytis cinerea



Anexo 3. Preparación solución maltodextrina: goma arábica



Anexo 4. Microencapsulación mediante secado por aspersión



Anexo 5. Microencapsulado obtenido mediante secado por aspersión



Anexo 6. Rendimiento microencapsulación mediante secado por aspersión

Peso inicial (Peso alimentado al inicio del proceso) = 213 g

Peso final (Peso recuperado al final del proceso) = 63,9 g

$$\text{Rendimiento microencapsulación (\%)} = \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento microencapsulación (\%)} = \frac{63,9 \text{ g}}{213} \times 100$$

$$\text{Rendimiento microencapsulación (\%)} = 30$$

Anexo 7. Preparación solución alginato de sodio – pasta conidial



Anexo 8. Microencapsulados obtenidos mediante gelificación iónica



Anexo 9. Rendimiento microencapsulación mediante gelificación iónica

Microesferas obtenidas (GE) = 45,3 g

Masa conidial usada (GC) = 1 g

Alginato de sodio usado (GA) = 1g

Cloruro de calcio usado (GC) = 5 g

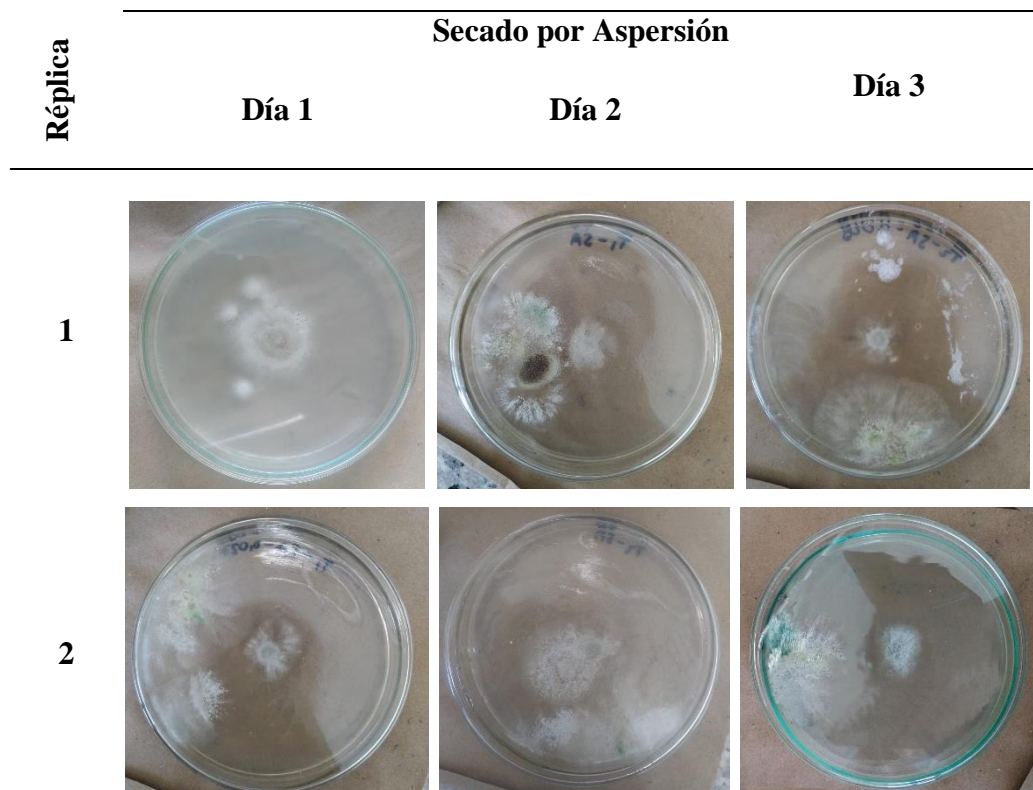
$$\text{Rendimiento microencapsulación (\%)} = \frac{GE}{GC + GA + GC} \times 100$$

$$\text{Rendimiento microencapsulación (\%)} = \frac{g}{1g + 1g + 5g} \times 100$$

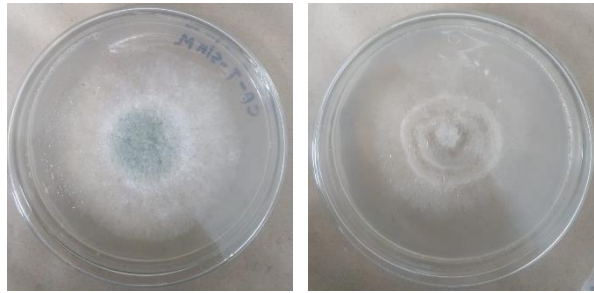
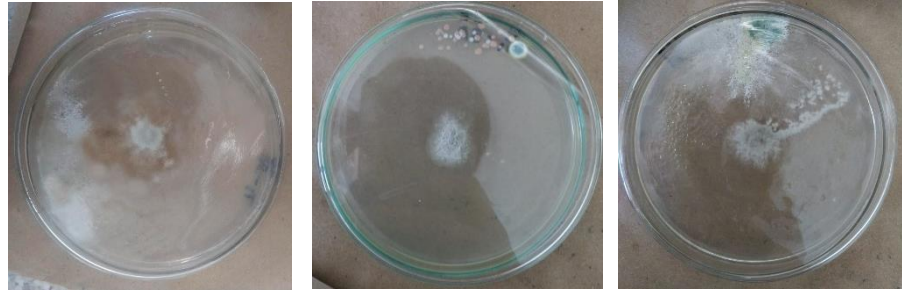
$$\text{Rendimiento microencapsulación (\%)} = \frac{45,3 g}{7 g} \times 100$$

$$\text{Rendimiento microencapsulación (\%)} = 647,14$$

Anexo 10. Antagonismo in vitro de Trichoderma harzianum sobre Botrytis cinerea (secado por aspersión)



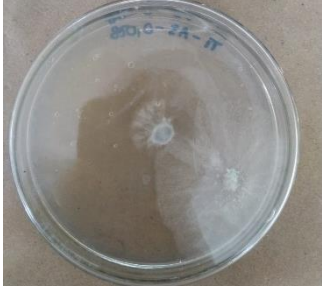



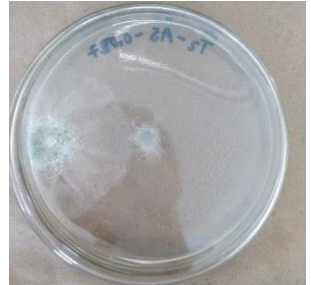
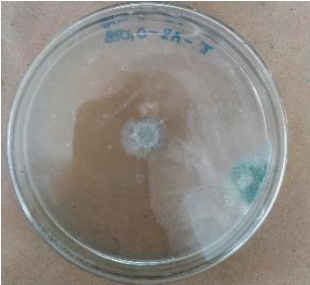
3



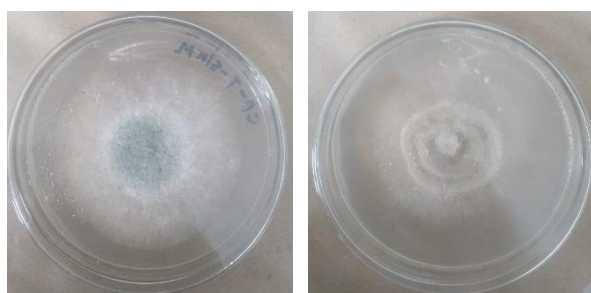
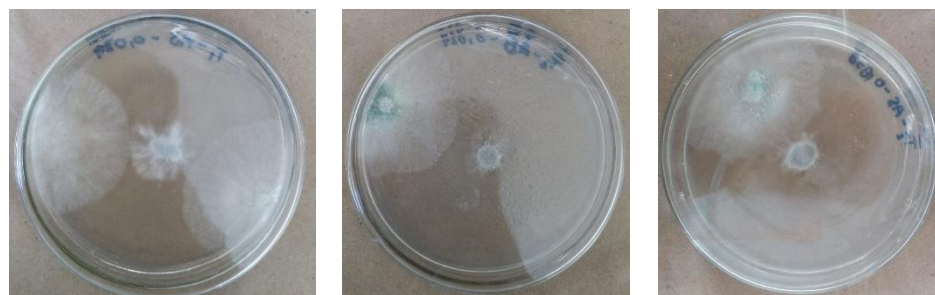
Control Positivo

Control Negativo

Anexo 11. Antagonismo in vitro de Trichoderma harzianum sobre Botrytis cinerea (Gelificación iónica)

Réplica	Gelificación iónica		
	Día 1	Día 2	Día 3
1			
2			

3



Control Positivo

Control Negativo

Anexo 12. Prueba de Tuckey aplicada a los días de incubación

(I) Días de incubación	(J) Días de incubación	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.
Día 1	Día 2	-8,738712496358900	3,924120676111642	,107
	Día 3	-16,263714923779034*	3,924120676111642	,004
Día 2	Día 1	8,738712496358900	3,924120676111642	,107
	Día 3	-7,525002427420134	3,924120676111642	,176
Día 3	Día 1	16,263714923779034*	3,924120676111642	,004