



*FACULTAD DE CIENCIAS
NATURALES Y EXACTAS*

**Aplicación de *Trichoderma harzianum*
Rifai (A-34) obtenido por fermentación
sólida en la producción de frijol caupí
Vigna unguiculata (L.) Walp.**

**Tesis presentada en opción al Título
Académico de Máster en Biotecnología
(Mención Ambiental)**

Autor:

Ing. Esli Lobaina Lobaina

Tutor (es):

MSc. Siannah María Más Diego

Dra. C. Teresa de los Milagros Orberá Ratón

2017



Universidad de Oriente

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial

Tesis en opción del título académico de Máster en Biotecnología

Mención Ambiental

Título: Aplicación de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) obtenido por fermentación sólida en la producción de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Autor: Ing. Esli Lobaina Lobaina

Tutores: MSc. Siannah María Más Diego
Dra. C. Teresa de los Milagros Orberá Ratón

Santiago de Cuba, 2017

Agradecimientos

A Dios por darme la vida y la fuerza para alcanzar todo lo logrado

A mi familia porque siempre se ha preocupado por mí y me ha apoyado cualquiera que fuera la situación

A los tutores por el apoyo brindado incondicionalmente

A Siannah por siempre estar disponible cualquiera fuera la situación

A mis amigos, compañeros de trabajo y aquellas personas que ayudaron de una forma u otra

Resumen

La presente investigación se realizó en la sala de fermentación perteneciente al Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, en Santiago de Cuba y los experimentos de campo se realizaron en la UEICA-H, teniendo como objetivo evaluar el empleo de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) obtenido por fermentación en fase sólida en la producción de frijol caupí. El empleo de este hongo como bioplaguicida y bioestimulante del crecimiento vegetal desempeña un papel fundamental en la agricultura en la protección de las plantas afectadas por las plagas y otros hongos que afectan las mismas, además posee la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas como consecuencia de los metabolitos secundarios que produce. La fermentación sobre soporte sólido es de fácil empleo y permite disminuir los insumos en productos químicos para la protección de los cultivos, los cuales representan un costo significativo en las producciones agrícolas. Con el sistema fermentativo sobre soporte sólido se obtiene una alta proporción de esporas, lo cual incide directamente en la supervivencia del hongo en el campo y en su efectividad como bioplaguicida y estimulante del crecimiento vegetal. El empleo de varios modelos matemáticos permite brindar una respuesta acertada del comportamiento del ajuste de los datos de crecimiento del microorganismo y predecir parámetros cinéticos importantes. En los experimentos de campo se les midió a las plantas de frijol caupí: porcentaje de emergencia, diámetro del tallo, alto de la plantas, número de vainas por plantas, semillas por vainas y se determinó el rendimiento final del cultivo. Se demuestra la posibilidad de emplear bagazo de caña como sustrato para la propagación en soporte sólido de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34), así como la capacidad de este hongo para estimular el crecimiento vegetal y el empleo de modelos matemáticos para evaluar el crecimiento del mismo. Los resultados obtenidos revelan que el empleo de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en la agricultura resulta ser una alternativa viable que contribuye a elevar el rendimiento de los cultivos y sustitución de agroquímicos de elevado valor. En la presente investigación se obtuvo un incremento en los rendimientos de 819,43 kg/ha; 665,81 kg/ha; 60,45 kg/ha para las variedades V-1, V-2 y V-3, a la aplicación de *Trichoderma* y el control. Otra alternativa que resulta de aporte económico es el usar bagazo de caña en las fermentaciones en fase sólida.

Abstract

The present research was carried out in the fermentation room belonging to the National Center for Applied Electromagnetism in Santiago de Cuba. Field experiments were carried out at the UEICA-H, with the objective of evaluating the use of *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) obtained by solid fermentation in cowpea production. The use of this fungus as a biopesticide and biostimulant of plant growth plays a fundamental role in agriculture in protecting plants affected by pests and other fungi that affect them. It also has the ability to stimulate the growth of plants as a consequence of the secondary metabolites it produces. The fermentation on solid support is easy to use and allows reducing the inputs in chemical products for the protection of the crops, which represent a significant cost in the agricultural productions. A high proportion of spores is obtained with the solid support system, which directly affects the survival of the fungus in the field and its effectiveness as a biopesticide and plant growth stimulant. The use of several mathematical models allows a correct response of the adjustment behavior of the microorganism growth data and predicts important kinetic parameters. In the field experiments, cowpea plants were measured: emergency percentage, stem diameter, plant height, number of pods per plant, seed per pods and the yield was determined the final yield of the crop. It is demonstrated the possibility of using sugar cane bagasse as a substrate for the solid support propagation of *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34), as well as the capacity of this fungus to stimulate plant growth and the use of mathematical models to evaluate its growth. The results show that the use of *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) in agriculture proves to be a viable alternative that contributes to increase crop yields and to replace high-value agrochemicals. In the present research an increase in yields of 819,43 kg / ha was obtained; 665,81 kg / ha; 60,45 kg / ha for the varieties V-1, V-2 and V-3, comparing the control experiments to those with the application of *Trichoderma*. Another alternative that results from economic contribution is the use of sugar cane bagasse on solid fermentations.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1. Revisión bibliográfica	8
1.1 Clasificación del género <i>Trichoderma</i>	8
1.2 Generalidades	8
1.3 Clasificación taxonómica	8
1.4 Modos de acción	9
1.5 <i>Trichoderma harzianum</i> como bioplaguicida	10
1.6 Fermentación sobre soporte sólido	10
1.7 Parámetros del proceso	12
1.7.1 Selección del sustrato	13
1.7.2 Tamaño de partícula	14
1.7.3 Temperatura de incubación	15
1.7.4 Control de pH	15
1.7.5 Humedad inicial	15
1.7.6 Aireación	16
1.8 <i>Trichoderma</i> como bioestimulante del crecimiento vegetal	16
1.9 Clasificación taxonómica del frijol caupí	17
1.10 Morfología	18
1.11 Importancia económica del frijol caupí <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	20
1.12 Modelos matemáticos empleados para describir crecimiento microbiano	21
Capítulo 2. Materiales y Métodos	22
2.1 Obtención y conservación de las cepas	22
2.2 Preparación del sustrato	23
2.3 Preparación del inóculo	23
2.4 Fermentación sólida	24
2.5 Descripción de los biorreactores	24
2.6 Diseño experimental y procesamiento estadístico	25
2.6.1 Selección de la escala	25
2.6.2 Selección del modelo matemático para la descripción del crecimiento	26
2.6.3 Efecto del <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (A-34 en la producción de frijol caupí	27
2.7 Concentración de esporas (Conteo en Cámara de Neubauer)	28
2.8 Determinación de proteínas totales	28
2.9 Determinación de la concentración de azúcares reductores en el extracto	29
2.10 Determinación de biomasa	30
2.11 Determinación del pH y humedad del cultivo	30
2.12 Velocidad específica de crecimiento	30
2.13 Productividad de biomasa	31
2.14 Actividades de campo	31
2.15 Caracterización del suelo	31
2.16 Cultivo utilizado	32
Capítulo 3. Análisis y discusión de los resultados	33

3.1 Valoración de las tecnologías existentes en la producción de <i>Trichoderma harzianum</i>	33
3.2 Efecto del cambio de escala en el consumo de azúcares reductores (ART).....	34
3.3 Efecto del cambio de escala en la producción de proteínas	35
3.4 Efecto del cambio de escala en la producción de biomasa.....	36
3.5 Análisis de la influencia del tamaño de los biorreactores en el crecimiento celular ..	37
3.6 Modelación matemática del crecimiento celular de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (A-34).....	39
3.7 Factores que influyen en la fermentación.....	41
3.8 Efecto de los diferentes tratamientos en el estado de emergencia de los cultivares de frijol	42
3.9 Efecto de los tratamientos en la altura de las plantas de los cultivares de frijol	43
3.10 Efecto de los tratamientos en el diámetro de las plantas de los cultivares de frijol .	45
3.11 Efecto de los tratamientos en el número de vainas de las plantas de los cultivares de frijol	46
3.12 Efecto de los tratamientos en el número de semillas por vainas de las plantas de los cultivares de frijol	47
3.13 Rendimientos de los cultivares de frijol	49
3.14 Análisis económico	50
Conclusiones	52
Recomendaciones	54
Anexos	65

Introducción

En nuestros días la contaminación de los suelos de producción agrícola se encuentra ocasionada principalmente por el uso excesivo de productos químicos, que se emplean con diferentes propósitos tales como: fertilizantes, insecticidas, acaricidas etc. (Sun, 2008). Estos no solo perjudican el medio ambiente, también pueden provocar afectaciones indirectas en la salud por el consumo de productos que contengan altas dosis de estos químicos (Li et al., 2008).

Los bioplaguicidas y biofertilizantes son alternativas empleadas para sustituir los plaguicidas químicos. *Trichoderma harzianum* es uno de los hongos que más se utilizan en la formulación de biopreparados debido a la capacidad que posee para enfrentar a otros hongos que son fitopatógenos. Además, posee gran capacidad de adaptación al medio en que se desarrolla y a los diferentes tipos de sustratos que es capaz de descomponer (Fernández-Larrea, 2007).

Desde 1960 se comenzó a utilizar *T. harzianum* en las industrias químicas, textil, alimentaría y la agrícola. Se puede encontrar especialmente en lugares que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición. Presenta varias ventajas como agente de control biológico y, además, resulta un estimulador del crecimiento vegetal. Los costos asociados a su producción no son excesivos resultando ser un factor económico beneficioso (Argumedo-Delira et al., 2009, Babu and Pallavi, 2013). Estudios realizados han demostrado que este hongo es capaz de sintetizar productos tales como el ácido indol acético (IAA) que es una fitohormona que actúa como reguladora del crecimiento vegetal (Hermosa et al., 2012). Además, puede solubilizar y movilizar nutrientes mediante la acción de enzimas y otros productos extracelulares que produce, facilitando la absorción de minerales y micronutrientes a las plantas (Vinale et al., 2008, Schuster and Schmoll, 2010, Brotman et al., 2013, Vinale et al., 2014b). Otro compuesto producido es Harzianolide, que es capaz de regular el crecimiento vegetal y ser elicitador de resistencia sistémica (Cai et al., 2013).

La producción a gran escala de *Trichoderma* tiene diversas ventajas, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, también produce una gran cantidad de

enzimas, inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos (Hölker and Lenz, 2005). Debido a la amplia gama de sustratos que puede utilizar se facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitat le permite ser un eficiente agente de control; de igual forma puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos (Elósegui Claro, 2006, Brotman et al., 2013).

Este hongo toma nutrientes de los hongos que degrada y de materiales orgánicos ayudando a su descomposición, por lo cual las incorporaciones de materia orgánica y compostaje lo favorecen. La velocidad de crecimiento de este organismo es bastante alta, por esto es capaz establecerse en el suelo rápidamente y controlar las enfermedades. Probablemente sea el hongo beneficioso más versátil y polifacético que abunda en los suelos (Argumedo-Delira et al., 2009).

No se conoce que sea patógeno de ninguna planta; sin embargo, es capaz de parasitar, controlar y destruir muchos hongos, nemátodos y otros fitopatógenos, que atacan y destruyen muchos cultivos; debido a ello, muchos investigadores le llaman el hongo hiperparásito. Ello convierte a *Trichoderma* en un microorganismo de imprescindible presencia en los suelos y cultivos, y de un incalculable valor agrícola (Cruzat and Ionannidis, 2008, Al-Hazmi and Tariq-Javeed, 2016).

Los procesos fermentativos de este hongo pueden desarrollarse en varias formas, las dos más comunes son los procesos sumergidos y los procesos sólidos o heterogéneos. Los primeros se caracterizan porque el microorganismo en cuestión crece en un medio líquido, generalmente agitado. En el segundo caso, el microorganismo crece sobre una matriz sólida en ausencia de agua libre en el sistema (Yoon et al., 2014).

El cultivo sumergido presenta grandes ventajas desde el punto de vista tecnológico, pues existe la posibilidad de mantener la temperatura y el pH constante, suministrar grandes cantidades de aire al sistema y dispersarlo mediante impelentes y, en general, crear las condiciones homogéneas necesarias para el crecimiento del microorganismo. Además, existen numerosas firmas que

producen reactores de tipo sumergido que se avienen a las necesidades del cliente. La producción a gran escala de levaduras y bacterias se ha llevado a cabo en cultivo sumergido, sin embargo, para el caso de los hongos, este sistema de fermentación no ha sido muy exitoso (Mussatto et al., 2012). Se plantea que en el cultivo sumergido se produce una proporción más alta de blastosporas que conidios. Aunque estas también son estructuras infecciosas, son poco resistentes a la temperatura, radiación y falta de humedad (Subramaniam and Vimala, 2012, Más-Diego et al., 2015).

Los procesos en fase sólida, por otra parte, tienen entre sus ventajas fundamentales que el hongo puede crecer en condiciones muy semejantes a aquellas en que el mismo se desarrolla en la naturaleza, produciendo conidios aéreos que son más resistentes y duraderos. Sin embargo, la heterogeneidad del medio implica dificultades en cuanto a la medición, muestreo y modelación del proceso. Se considera que los resultados que se obtienen son globales y empíricos, ya que, en la mayoría de los casos, este resulta artesanal (Lee et al., 2011). Para llevar a cabo la ingenierización de estos procesos fermentativos es necesario desarrollar fermentadores apropiados que permitan un sistema de control y medición adecuado (Schuster and Schmoll, 2010, Gupta et al., 2014). Se hace necesario emplear modelos matemáticos que permitan comprender el crecimiento cinético del microorganismo y su relación con los cambios en las variables que rigen el proceso productivo. La modelación resulta una herramienta útil, económica y rápida donde se ajustan modelos matemáticos que describen el crecimiento, la supervivencia, inactivación o procesos bioquímicos de un microorganismo bajo condiciones definidas, como la temperatura, que permiten a los investigadores hacer predicciones sobre los microorganismos estudiados (Naldi et al., 2010, Cepero et al., 2013).

La producción masiva de *Trichoderma* en fase sólida, no solo aseguraría una mayor producción de este agente de control biológico, sino que también se lograrían mayores resultados en las producciones agrícolas, gracias a la capacidad que posee *Trichoderma* como estimulante del crecimiento vegetal (Brotman et al., 2008, Brotman et al., 2013, Vinale et al., 2014a, Woo et al., 2014).

Estudios realizados por Rubio et al. (2012), Qi and Zhao (2013), Bemmezi (2015) y Hoyos-Carvajal et al. (2015) han demostrado la propiedad que tiene este hongo para interactuar con las plantas ya sea como estimulante del crecimiento vegetal o controlador biológico de fitopatógenos.

El frijol *Vigna unguiculata* (L.) Walp., también conocido como caupí, cowpea, cabecita negra y otros nombres según el país y la localidad específica (Murillo-Amador et al., 1997, Oporta and Rivas, 2006, Lagunes-Espinoza et al., 2008), es una leguminosa herbácea con hábito de crecimiento erecto, semierecto y rastrero, que crece entre 50 y 100 cm; bien adaptado a diferentes suelos y climas (Cook et al., 2005, Hernández, 2012b). Tiene su origen en Asia y los centros de diversidad genética están ubicados en África e India (Phansak et al., 2005); sin embargo, se siembra en varios países del continente africano, europeo y americano, siendo este último donde es más consumido (Apaez et al., 2009). Por ser una leguminosa de alto contenido nutricional es importante evaluarla, ya que de ella se alimenta un buen porcentaje de la población mundial (Singh et al., 2003, Lewis et al., 2005). Se cultiva en más de dos tercios de los países en desarrollo como un cultivo asociado a los principales cultivos de cereales (Agbogidi, 2010). *V. unguiculata* tiene varios usos, entre los que se pueden mencionar para abono verde (Beltrán et al., 2009), cobertura, heno, ensilaje, concentrado y alimentación humana (López and Bressani, 2008, Vargas et al., 2012), además de que se usa en la alimentación ganado (Ávila-Serrano et al., 2010, Sarmiento-Franco et al., 2010, Vendramini et al., 2012, Guillén, 2016) .

Es un cultivo importante en las regiones más secas de los trópicos cubriendo partes de Asia, Oceanía, Oriente Medio, el sur de Europa, África, el sur de EE.UU, y América Central y del Sur (Diouf and Hilu, 2005). El frijol caupí ocupa el primer lugar en importancia económica en el Caribe colombiano, donde es cultivado por pequeños agricultores en áreas que van desde 1 000 a 10 000 m² (Aramendiz and Espitia, 2011).

La especie se adapta fácilmente a diferentes condiciones estresantes (Gómez, 2013); sin embargo, es necesario considerar factores tales como el tipo de suelo,

el clima, la competencia con malezas (Shindoi et al., 2012, Cardona-Ayala et al., 2013), la variedad utilizada (Ávila-Serrano et al., 2010) y la época de siembra, que incide no solo en la producción sino en la presencia de plagas. El rendimiento del caupí varia con la época de siembra, la localidad y las condiciones de crecimiento (Murillo-Amador et al., 1997). La cantidad de semillas a utilizar depende de la cantidad de plantas/ha que se desea obtener; sin embargo, se debe considerar también la calidad de la semilla, el método de siembra y el tamaño de la semilla, además, la reducción de la distancia entre surcos mejora el aprovechamiento de la radiación solar y la competencia con las malezas (Apáez, 2010). Sin embargo, la interacción entre individuos provoca la reducción de la supervivencia y del crecimiento y/o la reproducción de por lo menos algunos de los individuos competidores implicados, aunque esto dependerá del clima, del suelo y de las especies usadas (Agbicodo and Visser, 2009, Dybzinski and Tilman, 2009).

La competencia puede tener efecto en el tiempo de maduración, la altura alcanzada por el cultivo así como en el número de vainas o frutos, existiendo una relación inversa entre la densidad y las variables anteriores. Guillén (2016) reporta un incremento en el rendimiento con el aumento de las densidades de siembra, así como una disminución en el peso de las semillas.

El fríjol caupí es altamente susceptible a enfermedades virales y a una amplia gama de plagas como los trips, perforador de la vaina, áfidos, etc., que limitan el potencial de rendimiento que se estima entre 1,5 a 3,0 t ha⁻¹ (Aliyu, 2007). Estudios realizados por Kamala and Indira (2011) demuestran como especies de *Pythium aphanidermatum* que son agentes causantes del damping-off de las plantas de frijol, provocan pérdidas de cosechas y bajos rendimientos, pudiendo ser controlados por la acción de *Trichoderma* (Banaay et al., 2012). Otras enfermedades que pueden causar afectaciones en las cosechas de frijol son las enfermedades fungosas como la roya [*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger var. *appendiculatus* Wint.], la mancha angular [*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris] y la antracnosis [*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib]; por este factor se han reportado pérdidas de rendimiento del 25-95% (López Salinas et al., 2007b). Otros estudios realizados evidencian cómo las

características genotípicas afectan las variables agronómicas de forma positiva o negativamente (Medina et al., 1996b, Garcès Fiallos et al., 2012). Además, existen otros factores abióticos como la concentración de sales, metales pesados y limitaciones hídricas que pueden ser causantes del estrés de las plantas y que provocan el descenso en los rendimientos (Gómez Padilla et al., 2013, Agbicodo and Visser, 2009, Zhu, 2001). En investigaciones realizadas por Hanada (2008), Vinale et al. (2009), Kamala and Indira (2011), (Hoyos-Carvajal et al., 2015), Vinale et al. (2014b) y Woo et al. (2014) se ha demostrado la influencia de *Trichoderma* como agente de control biológico o como bioestimulante del crecimiento vegetal.

Diseño metodológico de la investigación

Objetivo general: Evaluar el empleo de *Trichoderma harzianum* obtenido por fermentación sólida sobre bagazo de caña como bioestimulante de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Objetivos específicos:

1. Valorar las tecnologías existentes para la obtención de *Trichoderma harzianum*.
2. Evaluar el crecimiento del *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en un biorreactor de cama empacada usando como sustrato bagazo de caña a dos escalas diferentes.
3. Evaluar modelos matemáticos para describir el crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en fermentación sólida.
4. Evaluar el efecto del biopreparado de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) sobre variedades frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Problema: Poca disponibilidad de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. para el alimento de la población por la baja germinación o emergencia de las semillas de algunas variedades, debido a las características genéticas y fisiológicas.

Hipótesis: Si se aplica *Trichoderma harzianum* obtenido por fermentación sólida a las semillas de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. aumentará la producción de estas variedades.

Objeto de estudio: Semillas de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. con aplicación de *Trichoderma harzianum* obtenido por fermentación sólida.

Novedad de la investigación:

1. Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en un biorreactor de cama empacada usando como sustrato bagazo de caña a dos escalas diferentes.
2. Evaluación del efecto estimulante de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en la germinación o emergencia de las semillas de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp.
3. Empleo de modelos matemáticos para evaluar el crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en sustrato sólido.

Capítulo 1. Revisión bibliográfica

1.1 Clasificación del género *Trichoderma*

Los hongos constituyen un grupo heterogéneo de organismos eucariotas entre los que se encuentran los mohos, las levaduras y las setas, en los cuales las relaciones de origen y afinidad no siempre quedan claras; su clasificación sigue siendo muy discutida y cambiante. Estos, a diferencia de las plantas, poseen una pared celular compuesta por quitina, mientras la pared celular de las plantas está compuesta por celulosa (Kubicek et al., 2008, Gupta et al., 2014).

1.2 Generalidades

El género *Trichoderma* pertenece a un grupo aislado de hongos imperfectos, que se pueden encontrar de forma común en el suelo, árboles caídos, etc. Se reproducen asexualmente por conidios, su pared celular está compuesta por quitina y glucano. En su reproducción los micelios forman una superficie blanca clara y más tarde se presentan de color verde azulado oscuro (Kuhls et al., 1997). Muchas cepas crecen eficientemente en medio sólido o líquido en un amplio rango de temperatura y resisten bajos niveles de humedad, además de su crecimiento en suelos ácidos (Elósegui Claro, 2006, Agamez Ramos et al., 2008, Sivila and Alvarez, 2013).

1.3 Clasificación taxonómica

El género *Trichoderma* pertenece a un grupo aislado de hongos imperfectos (Kubicek and Harman, 1998). La taxonomía moderna de los hongos elimina la subdivisión Deuteromicotina a la que pertenecía el género *Trichoderma*, por lo que la posición taxonómica actual de *Trichoderma sp.* se presenta como se muestra (Jaklitsch and Voglmayr, 2013, Chaverri et al., 2015):

- **División:** Amastigomicota y/o Eumycota
- **Subdivisión:** *Ascomicotina*
- **Clase:** Sordariomicetos
- **Orden:** Hypocreales
- **Familia:** *Hypocraceae*

- **Género:** *Trichoderma*

Entre las especies más conocidas del género *Trichoderma* están *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum*. Estas especies de *Trichoderma* son antagonistas de otros hongos. Se caracterizan por la presencia de derivados de la piran-2-ona y más particularmente de análogos de la pentil-piran-2-ona (El-hasan et al., 2009, Hermosa et al., 2012). Este potente antagonista inhibe notablemente el crecimiento de *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora nicotianae* y *Sclerotium rolfsii* (Rocha-Ramirez, 2002, Galindo et al., 2004). En un estudio de semillas de lechuga expuestas a *R. solani*, se observaron tasas de supervivencia de 80 a 90 % contra 35 a 40 % para los controles no tratados (Stefanova et al., 1999a).

1.4 Modos de acción

Trichoderma está asociado a la descomposición de la materia orgánica que hay en el suelo y por el antagonismo con microorganismos patógenos a las plantas usando procesos de amensalismo, depredación, parasitismo y competencia, y por su hiperparasitismo (Elósegui Claro, 2006, Schuster and Schmoll, 2010). Su modo de acción es complejo donde están incluidos el quimiotaxis, la antibiosis y el parasitismo. La interacción inicial entre el parásito y el hospedero parece ser del tipo quimiotrófico. Libera compuestos antibióticos y compuestos enzimáticos extracelulares que inhiben el desarrollo de hongos fitopatógenos. También produce metabolitos como viridín, trichodermin, glioviridin, gliotoxina y harzianolide, siendo de todas estas micotoxinas la más representativa el trichodermin que actúa inhibiendo la actividad ribosomal de los patógenos (Sivila and Alvarez, 2013). La hifa del micoparásito crece directamente hacia el hospedero en respuesta a las lectinas secretadas por este, las que se unen a los residuos de galactosa en la pared celular de *Trichoderma*, siendo la señal que permite dirigir el crecimiento hacia esa zona. Después del contacto físico, microscópicamente se observa la presencia de haustorios, enrollamiento de la hifa del biocontrol sobre la del patógeno, vacuolización, formación de gránulos, desintegración del citoplasma y lisis celular (Elósegui Claro, 2006).

1.5 *Trichoderma harzianum* como bioplaguicida

El *Trichoderma* es conocido por su capacidad de controlar enfermedades de tipo fungosas y control de plagas que atacan las plantas y principalmente los cultivos de hortalizas (tomate, lechuga, etc.) y otros cultivos de gran importancia económica (café y tabaco) (Rodríguez et al., 2008, Sivila and Alvarez, 2013). Hongos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phythium* sp., *Colletotrichum* so., *Fusarium oxysporum* que son fitopatógenos y causante de enfermedades fungosas tales como el Damping-Off de cultivos, pudrición de tubérculos, afectaciones a posturas, pudrición de frutos, etc (Banaay et al., 2012). Pueden ser controlados por la acción de *Trichoderma* (Harman et al., 2004a, Cruzat and Ionannidis, 2008, Martínez et al., 2013). Los daños severos causados por estos hongos fitopatógenos pueden provocar el colapso total en las plantas, fundamentalmente en la fase temprana del cultivo. *Trichoderma* es capaz de secretar enzimas y otros compuestos que actúan como un complejo con acción sinérgica sobre el patógeno debilitándolos y ocasionando la necrosis celular (Asad et al., 2015, Al-Hazmi and Tariq-Javeed, 2016).

1.6 Fermentación sobre soporte sólido

La fermentación sobre soporte sólido (FSS) consiste en el crecimiento de microorganismos sobre soportes sólidos húmedos en ausencia de agua libre (Pandey et al., 2001). En este sistema, el agua está presente en el sustrato, cuya capacidad de retención varía según el tipo de material (Bhargav et al., 2008, Chen, 2013b).

La definición más acertada de la FSS es la formulada a partir de lo planteado por López-Isunza F et al. (1997), Chen (2013a) y Chen (2013b) quienes la describen como un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos con capacidad para absorber y contener agua, ya sea con o sin nutrientes solubles. Por este motivo, se trata de un proceso donde el sólido presenta una baja actividad del agua, lo que influye en aspectos fisiológicos de los microorganismos como son el tipo de crecimiento, la esporulación y la germinación

de esporas, además de la producción de metabolitos y enzimas y la actividad de las mismas (Hölker and Lenz, 2005).

La FSS es una técnica que está principalmente enfocada a la producción de alimentos, enzimas hidrolíticas, ácidos orgánicos, giberelinas, saborizantes y bioplaguicidas (Raimbault, 1998). Generalmente, para la obtención de estos productos se utilizan como sustratos sólidos residuos agroindustriales (Pandey et al., 2001, Mussatto et al., 2012), lo que resulta de gran importancia pues se obtienen productos de gran interés industrial y por otro lado se resuelven problemas medioambientales como la deposición de residuos sólidos. De esta forma, sustratos de bajo costo como los residuos de fruta y verdura, cortezas de árboles, cáscara de frutos secos, salvado de trigo, cáscara de café, bagazo de caña de azúcar, etc., pueden ser utilizados para la producción de enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos y metabolitos secundarios biológicamente activos, entre otros (Yoon et al., 2014).

Las FSS constituyen una forma especialmente avanzada de cultivo, además de las ventajas que presenta (Bhargav et al., 2008, Thomas et al., 2013, Chen, 2013a, Abu Yazid et al., 2017):

1. La posibilidad de emplear medios naturales o lo más semejantes posibles, que son las condiciones normales en las que se desarrollan los microorganismos.
2. Desarrollar las fermentaciones a altas concentraciones de sustratos y, por tanto, lograr titulaciones más altas.
3. Un recobrado más eficiente y económico de los productos por el hecho de estar más concentrados al compararse con procesos de fermentación sumergida.
4. La reducción al mínimo de los efluentes del sistema y, por consiguiente, de la contaminación ambiental.

Este proceso requiere bajos niveles nutricionales y se produce menor cantidad de agua residual en comparación con los procesos de fermentación líquida (Gervais and Molin, 2003, Pandey et al., 2008).

La técnica de fermentación sólida consta de las siguientes etapas:

- 1) preparación de la mezcla sólida;
- 2) reducción de la carga microbiana mediante la inyección directa de vapor de agua o por esterilización en autoclave;
- 3) inoculación de la matriz sólida con un inóculo líquido;
- 4) ajuste de la humedad y del pH;
- 5) puesta del medio en el fermentador;
- 6) inyección continua o intermitente de aire a temperatura y humedad controladas;
- 7) secado hasta obtener la humedad residual deseada;
- 8) molienda o adecuación de tamaño de partícula;
- 9) obtención del ingrediente activo.

Otros aspectos a tener en cuenta son los parámetros fisicoquímicos y bioquímicos del sustrato y del microorganismo con que se desea trabajar.

El estudio de parámetros como la temperatura, la aireación, la humedad, la agitación, el tamaño de partícula, el diseño del reactor, etc., es fundamental para el éxito de la FSS debido a que de ellos va a depender tanto el crecimiento del microorganismo como la formación del producto final (Dustet Mendoza et al., 2002, Durand, 2003, Kalogeris et al., 2003, Más-Diego et al., 2013)

1.7 Parámetros del proceso

La elección de los parámetros de operación y su optimización juega un papel fundamental en la FSS. Estos incluyen parámetros fisicoquímicos y bioquímicos como: el tamaño de partícula, la humedad inicial, el pH, el pre tratamiento del sustrato, la humedad relativa, la temperatura de incubación, la agitación, la aireación, el volumen y la edad del inóculo, la composición del medio de cultivo, la suplementación con microelementos como sales e inductores del crecimiento así como de elementos traza, la extracción del producto y su posterior purificación, etc. (Dustet Mendoza et al., 2002, Durand, 2003, Gervais and Molin, 2003, Raghavarao et al., 2003, Fernandez-Fernandez et al., 2005).

1.7.1 Selección del sustrato

La estructura y origen de los sustratos tienen un impacto decisivo en la capacidad de los microorganismos de sobrevivir y en el cumplimiento de la función que se desea. Cuando alguno de los sustratos presenta una baja solubilidad en agua, se encuentra poco biodisponible para los microorganismos y la reacción bioquímica se verá “demorada” por un problema de transferencia de masa.

La selección del sustrato debe ser de forma tal que supla los nutrientes necesarios para el desarrollo del microorganismo y produzca una adecuada cantidad de biomasa del modo más económico posible. Los nutrientes que garantizan una adecuada reproducción del microorganismo incluyen la fuente de carbono, nitrógeno, sales, etc. (Rodríguez-León et al., 1999). Estas fuentes nutricionales las podemos encontrar en productos como: bagazo de caña, trigo, melaza, arroz, maíz, café, pulpa de remolacha, y harina de trigo, entre otros (Rodríguez-León et al., 1999, Chen et al., 2011, Mussatto et al., 2012).

Los medios de cultivo empleados para la producción a grandes escalas contienen ingredientes de naturaleza variable y no definida, y en ocasiones son sometidos a un proceso de pre tratamiento con el objetivo de convertir estos materiales en sustancias más utilizables por los microorganismos. Parte de este pretratamiento se realiza con adición de azúcares simples y otros electos nutricionales que complementen los requerimientos nutricionales que necesite el microorganismo, la reducción del tamaño también forma parte de este pretratamiento (Elóseguí Claro, 2006, Albuquerque, 2003).

El *Trichoderma* es capaz de degradar sustratos muy complejos tales como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos como fuente de carbono para su crecimiento gracias a la variada gama de enzimas que posee (enzimas hidrolíticas tales como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras), aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos como fuente de carbono (Gupta et al., 2014).

1.7.2 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula del sustrato puede ser causante de problemas, ya que este define la granulometría del medio. Durante el proceso de fermentación las reacciones ocurridas generan calor, por tanto se hace necesaria la circulación de aire. Un tamaño de partícula pequeño puede producir una compactación del sustrato sólido dificultando los procesos de transferencia de calor y masa (Albuquerque, 2003). Con tamaños de partículas pequeños el área de contacto entre el micelio de los microorganismos y los sustratos, se incrementa; pero a su vez, se limita el intercambio de gases al reducirse el espacio entre las partículas. Por el contrario, con tamaños de partícula grandes, el área de contacto entre el micelio de los microorganismos y los sustratos se reduce, pero el intercambio gaseoso mejora al incrementarse el espacio entre las partículas de los sustratos (Lonsane et al., 1985, Dustet Mendoza et al., 2002, Durand, 2003, Fernandez-Fernandez et al., 2005). Estos procesos fermentativos se desempeñan en fase aerobia, por lo que debe existir una disponibilidad de oxígeno para alcanzar el crecimiento microbiano. La disponibilidad del oxígeno evita la formación de gradientes de masa y calor, trayendo consigo que el crecimiento no sea homogéneo y disminuyendo la productividad del proceso (Mazutti et al., 2007).

Kumar et al. (2003) estudiaron la influencia del tamaño de partícula del sustrato en la producción de ácido cítrico a partir de bagazo de caña de azúcar utilizando el hongo *Aspergillus niger*. Los tamaños de partículas evaluados se encontraban en un rango comprendido entre 0,64 y 2,00 mm. Los resultados del estudio determinaron que la máxima producción se obtenía cuando se utilizaban partículas de 1,2-1,6 mm, mientras que los valores más bajos se analizaban con partículas de 1,6-2,0 mm. Esto podría deberse a que las partículas de tamaño medio utilizadas presentaban mayor porosidad, lo que provoca una mejor transferencia de calor y masa aumentando la producción (Día, 2009).

1.7.3 Temperatura de incubación

La temperatura es uno de los factores más importantes a tener en cuenta para un correcto desarrollo de los microorganismos y el desarrollo de las reacciones químicas pertinentes (Raghavarao et al., 2003).

Un descontrol en la temperatura puede ocasionar inconvenientes en el desarrollo microbiano, un aumento de la temperatura puede causar un descenso o detención de la actividad microbiana.

Estudios realizados han definido que el rango recomendable de crecimiento para el *Trichoderma* se encuentra entre los 10 °C y los 40 °C, considerándose una temperatura óptima de 25 °C (Gupta et al., 2014, Subash et al., 2013, Zhang and Yang, 2015).

1.7.4 Control de pH

En la FSS es dificultoso controlar varios parámetros que rigen el crecimiento y desarrollo de los microorganismos. Dentro de ellos tenemos el control del pH. Este parámetro puede verse afectado debido a que durante la fermentación ocurre un proceso de degradación de los azúcares presentes dando lugar a la formación de ácidos orgánicos. A medida que los ácidos orgánicos presentes en el sustrato son asimilados, el pH aumenta. El rango de pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos se encuentra entre 5 y 8, aunque la mayor parte de los hongos están adaptados a un rango más amplio de pH. Sin embargo, para la mayoría, alteraciones bruscas del pH del medio podrían tener efectos adversos sobre el microorganismo, afectando a la membrana y al transporte de solutos e inhibiendo la actividad de las enzimas (Kumar et al., 2003). De modo general, en la FSS los valores de pH son bajos, favoreciendo el crecimiento de hongos y levaduras y dificultando el crecimiento de bacterias (Albuquerque, 2003).

1.7.5 Humedad inicial

En las FSS es necesario mantener un nivel óptimo de humedad, pues un exceso provocaría una baja reserva de oxígeno y esto provoca una afectación directa en el desarrollo microbiano. Por otro lado, altos valores de humedad causarían una

compactación del sustrato evitando la colonización en toda la superficie. Los nutrientes a consumir por los microorganismos mayormente se encuentran en solución. Bajos valores de humedad originan un descenso en la solución de nutrientes a consumir y esto ocasionaría una inhibición en el desarrollo (Elósegui Claro, 2006).

El contenido óptimo de humedad para el crecimiento de los hongos sobre sustratos sólidos en la FSS se encuentra entre el 40 y el 70%, pero depende del microorganismo y el sólido utilizado para cada cultivo. Según los estudios realizados sobre la FSS para *Trichoderma* el valor de humedad debe encontrarse alrededor del 50 % (Gervais and Molin, 2003).

1.7.6 Aireación

Trichoderma harzianum es un hongo de desarrollo aerobio. El papel de la aireación en este caso es mantener las condiciones aerobias, garantizar la eliminación del CO₂ producto de la respiración celular y mantener la temperatura y el nivel de humedad de los sustratos. La tasa de aireación depende de la porosidad del medio, debiéndose optimizar los parámetros para cada tipo de sustrato, microorganismo y proceso. La aireación tiene una influencia directa en la producción de biomasa, por lo que es necesaria para mantener los niveles de oxígeno que los microorganismos requieren en su metabolismo. Para lograr un buen rendimiento de la fermentación es necesaria un área superficial grande de sustrato, en la cual el microorganismo pueda mantener contacto con el aire (Albuquerque, 2003).

1.8 *Trichoderma* como bioestimulante del crecimiento vegetal

Algunas cepas pertenecientes a especies como *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. virens* han mostrado capacidad para promover el crecimiento y el desarrollo de las raíces de las plantas (Yedidia et al., 1999), lo cual implica un incremento de la productividad en los cultivos (Harman et al., 2004a). Para explicar este hecho se habían sugerido varios mecanismos como son la producción de factores de crecimiento y vitaminas, el control de patógenos menores, o la conversión de material no utilizable (metales como zinc, manganeso, hierro, cobre) en formas

que puedan ser asimiladas por las plantas (Samolski et al., 2012). Además, su capacidad para reducir la disponibilidad de etileno en las plantas, disminuyendo los niveles de su molécula precursora, promueve el crecimiento de las mismas (Viterbo et al., 2010).

Son bien conocidos los efectos beneficiosos de *Trichoderma* en plantas, si bien muchos de los múltiples mecanismos por los que ejercen estos beneficios son todavía desconocidos. Se ha demostrado que *T. harzianum* reduce la acumulación de ROS (especies reactivas de oxígeno) en las plantas y también aminora los daños provocados por factores de estrés como sequía, salinidad, frío y calor (Mastouri et al., 2010).

Se ha demostrado que, al colonizar las raíces, *Trichoderma* estimula los mecanismos de defensa de la planta, lo que conlleva un incremento de su resistencia frente a varios microorganismos (Harman et al., 2004b, Harman et al., 2004a). La respuesta de la planta incluye la secreción de peroxidasas, síntesis de fitoalexinas (Howell et al., 2000), expresión de genes que codifican proteínas PR (relacionadas con la patogénesis: proteínas producidas por la planta como respuesta a patógenos y heridas), biosíntesis de compuestos terpénicos (Howell, 2006), o la modificación de los niveles de ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico (Bernstein et al., 2010, Shores et al., 2010, Djonovic, 2007, Segarra, 2007, Moran-Diez, 2009, Morán-Diez et al., 2015)

Además, varios trabajos han demostrado el efecto protector de *Trichoderma*, incluso en ausencia de patógeno, es decir, estimula a la planta para responder de forma más rápida y más intensa frente al ataque de un patógeno (Malmierca et al., 2013).

1.9 Clasificación taxonómica del frijol caupí

La clasificación taxonómica de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. fue descrita por Padulosi and Ng (1997) y publicada en Repertorium Botanices Systematicae (Forzza, 2010). Para el presente trabajo se toma la reportada por Tomooka et al. (2014).

- **Reino:** *Plantae*

- **División:** *Magnoliophyta*
- **Clase:** *Magnoliopsida*
- **Subclase:** *Rosidae*
- **Orden:** *Fabales*
- **Familia:** *Fabaceae*
- **Subfamilia:** *Faboideae*
- **Tribu:** *Phaseoleae*
- **Subtribu:** *Phaseolinae*
- **Género:** *Vigna*
- **Especie:** *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

1.10 Morfología

Es una planta con un sistema radicular bien desarrollado, compuesto de una raíz principal y muchas raíces secundarias. Los tallos son delgados y débiles, angulosos, y de alturas muy variables. El porte de la planta está determinado por la forma de los tallos. Si el tallo principal presenta una inflorescencia terminal, la planta tendrá un crecimiento determinado (variedades enanas o erectas). Si el tallo no produce esta inflorescencia terminal y las inflorescencias aparecen en las axilas, la planta tendrá un crecimiento indeterminado (variedades guiadoras o trepadoras) (Singh, 2005, Tomooka et al., 2014).

Existen variedades precoces o de maduración uniforme (70 días) de tipo determinado y las tardías (6 a 8 meses), de tipo indeterminado, que presentan maduración desigual (Padulosi and Ng, 1997, Aziagba et al., 2016).

Partes del Frijol

Raíz: Es profunda y pivotante (hasta 1,95 m), tiene abundantes ramificaciones laterales, pudiendo alcanzar una longitud de 1,40 m, por lo que las plantas pueden absorber mayor cantidad de agua y nutrientes en comparación con los frijoles comunes. En sus raíces crecen los nódulos, que son protuberancias donde viven las bacterias del género *Rhizobium*, encargadas de fijar el nitrógeno del aire y que la planta utiliza para su nutrición (Apáez, 2010).

Tallos y Ramas: Los tallos y las ramas presentan una forma cilíndrica con ligeros bordes, algunas veces son glabros (sin pubescencia) y huecos. Presentan diferente coloración de acuerdo a la especie. El número de entrenudos y guías o ramas laterales es variado y en los tipos indeterminados al crecer las ramas laterales tienden a enrollarse y entrelazarse. La ramificación se origina en la parte basal del tallo y comienza a los 15 o 20 días después de la emergencia. La planta presenta diferentes hábitos de crecimiento: erecto, semierecto, postrado y semipostrado. El tamaño de la planta varía entre 25 cm (tipos erectos) y 80 cm (tipos semierectos). En los postrados, no se registra altura de planta (Tomooka et al., 2014).

Hojas: Las hojas primarias o embrionarias son unifoliadas y crecen de manera opuesta y las hojas verdaderas son trifoliadas. La forma de los folíolos puede ser lineal, lanceolada u ovalada. La orientación de las hojas es de tipo plano en las variedades cultivadas y erectas en las variedades silvestres. El área foliar se incrementa con la edad de la planta. El número de hojas producido por cada planta es alto, de ahí que el frijol caupí pueda usarse como forraje o abono verde. En la etapa de fructificación las hojas caen y este proceso se acentúa cuando existe déficit de agua (Padulosi and Ng, 1997, Aziagba et al., 2016).

Inflorescencia y flor: El primer tallo floral se origina en la axila, entre las hojas y el tallo, se desarrolla en la parte media de las plantas; a partir de esta, la floración progresa hacia arriba y hacia abajo. Las flores se dan en pequeños racimos y dependiendo de la variedad, son blancas, blancas con manchas moradas, moradas o amarillas. Presentan 5 pétalos que reciben nombres específicos, un estandarte, dos alas y dos pétalos soldados que forman la quilla. Las flores son hermafroditas, por lo que son preferentemente autógamas. Sin embargo, existe un 5 % de polinización cruzada, principalmente por insectos (Barbosa and de Sousa, 2017).

Fruto: Es una vaina lineal o encorvada que alcanza un tamaño de 10 a 25 cm. de longitud y de 1,5 a 3,2 cm de diámetro. Contiene de 6 a 21 granos por vaina. Las vainas pueden ser de color verde o presentar moteados púrpura o rojizo en sutura

y valvas. Las valvas están adheridas al pedúnculo formando ángulos de 30 a 90°; son erectos o colgantes, dependiendo del ángulo que formen. Por su forma las vainas pueden ser derechas o presentar cierto grado de curvatura. Generalmente en cada tallo floral sólo 2 ó 3 flores se convierten en vainas. Las semillas se desarrollan en las vainas de 20 a 25 días (Barbosa and de Sousa, 2017).

1.11 Importancia económica del frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

La familia *Leguminosae* es vital en la base nutricional actual, debido a que alimenta la mayoría de la población mundial (Singh et al., 2003, Lewis et al., 2005). El frijol caupí es una leguminosa originaria de África, cultivada predominantemente en regiones tropicales y subtropicales (Singh et al., 2003). Es uno de los cultivos más adaptados, versátiles y nutritivos con un alto contenido proteico, importante en la dieta alimenticia para la población de países en vía de desarrollo (Ramakrishnan et al., 2005).

Posee un alto contenido en proteínas y fibra, siendo una fuente excelente de minerales, como el potasio, hierro, selenio, molibdeno y ácido fólico (De Gouveia et al., 2011, Aramendiz, 2013).

Tabla 1.1 Valor nutricional por cada 100 g de *Vigna unguiculata* (USDA, 2016)

Valor energético			484 kJ
Carbohidratos	20,76 g	Vitamina E	0,280 mg (2%)
• Azúcares	3,30 g	Vitamina K	1,7 µg (2%)
• Fibra alimentaria	6,50 g	Calcio	24 mg (2%)
Grasas	0,53 g	Hierro	2,51 mg (20%)
Proteínas	7,73 g	Magnesio	5 mg (14%)
Tiamina (vit. B ₁)	0,202 mg (16%)	Manganeso	0,475 mg (24%)
Riboflavina (vit. B ₂)	0,055 mg (4%)	Fósforo	156 mg (22%)
Niacina (vit. B ₃)	0,495 mg (3%)	Potasio	278 mg (6%)
Ácido pantoténico (vit. B ₅)	0,411 mg (8%)	Sodio	4 mg (0%)
Vitamina B ₆	0,100 mg (8%)	Zinc	1,29 mg (13%)

1.12 Modelos matemáticos empleados para describir crecimiento microbiano

Los modelos matemáticos son una herramienta útil que ya que permite analizar en forma cuantitativa el comportamiento microbiano en un determinado ambiente o sistema particular, es decir, permite realizar estimaciones cuantitativas, considerando la acción simultánea de diversos factores limitantes extrínsecos e intrínsecos; lo cual implica una gran ventaja, en tiempo y costo, comparado a los métodos utilizados tradicionalmente (Cayre et al., 2001, Cepero et al., 2013). Dentro del área de la ingeniería, los modelos matemáticos se proponen basados en un conjunto de hipótesis que satisfacen el fenómeno natural estudiado. Sin embargo, se torna común que los modelos matemáticos sean utilizados por los investigadores de forma indiscriminada, sin verificar la previa validez de las hipótesis que lo soportan (Hernández, 2012a). Dentro de los modelos de mayor aplicación a los procesos de crecimiento microbiano son el de Gompertz, Logístico y el propuesto por Richards con sus diferentes modificaciones (Mitchell et al., 2004, González et al., 2016). El desarrollo de modelos para describir los fenómenos biológicos y de transporte durante el proceso fermentativo mejoró la comprensión de muchos aspectos de la FES (Pandey, 2003): la bioquímica, la ingeniería de procesos (Raghavarao et al., 2003), el diseño y la operación y escala de los biorreactores (Mitchell et al., 2003). En el caso de las FES rústicas, la modelación matemática es también una herramienta muy importante para escalar los estudios que se realizan en el laboratorio (Sosa et al., 2012).

Capítulo 2. Materiales y Métodos

El proceso experimental se desarrolló en el laboratorio de microbiología perteneciente al Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) y en la Unidad de Extensión, Investigación y Capacitación Agropecuaria de la provincia de Holguín (UEICA-H). La parte fermentativa de la investigación se desarrolló en el CNEA y los experimentos de campo se realizaron en la UEICA-H. En este capítulo se explica el comportamiento del proceso experimental.

Los experimentos de laboratorio se desarrollaron según la modificación del esquema propuesto por Más-Diego (2006) que se muestra en la Figura 2.1.

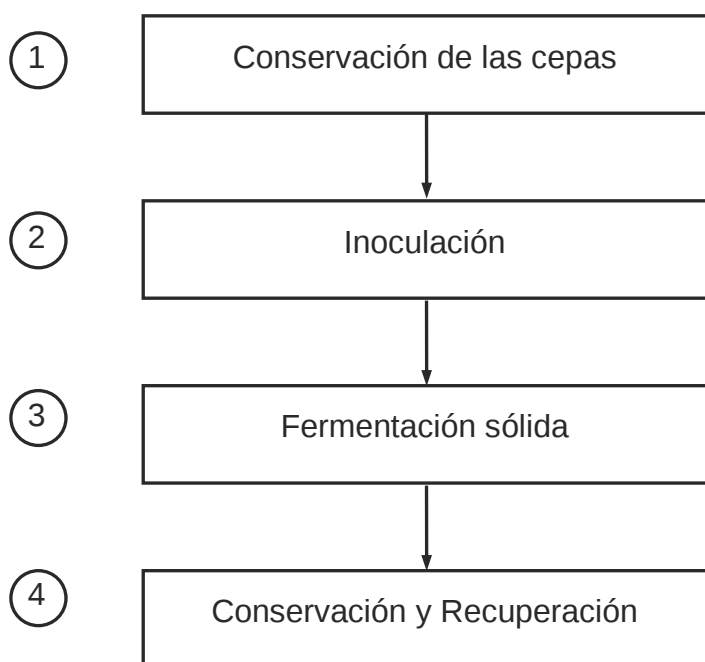


Figura 2.1 Etapas para la producción y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34)

2.1 Obtención y conservación de las cepas

El microorganismo empleado en la fermentación es *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34), proveniente del banco de cepas del Instituto Nacional de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana. Fue conservada en el banco de cepas del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, Santiago de Cuba.

Se utilizó como medio de conservación Papa Dextrosa Agar (PDA). Se le ajustó el pH a 5,4 y se esterilizó durante 20 min en una autoclave a 1 atm y 121 °C. La cepa fue conservada en plano inclinado y se incubaron a entre 28 y 30 °C.

2.2 Preparación del sustrato

Los experimentos se realizaron por duplicado a dos escalas diferentes: 200 g de sustrato en recipientes de 5 L de capacidad y 100 g de sustrato en recipientes de 2 L. Como sustrato se empleó el bagazo de caña proveniente del CAI “Paquito Rosalez” de la zafra 2010 – 2011. Primeramente fue tamizado hasta lograr un tamaño de partícula (-3 +0,5) mm.

En los vasos de precipitado de mayor capacidad se pesaron 160 g de bagazo de caña y 40 g de polvo de arroz. Para los de menores tamaños se pesaron 80 g de bagazo de caña y 20 g de polvo de arroz, lográndose un enriquecimiento en el sustrato compuesto por 80 % de bagazo de caña y 20 % de polvo de arroz. Se ajustó la humedad del medio al 50 %, de este modo se le añadieron 100 y 50 mL de agua destilada, respectivamente. Posteriormente se esterilizó durante 20 min en una autoclave a 1 atm y 121 °C.

2.3 Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se tomaron 6 cuñas de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) y 600 mL de agua destilada, esta se fue añadiendo en las cepas y cerca de un mechero para evitar la contaminación del inóculo, con una aguja de siembra se fueron desprendiendo las esporas. Se añadió 100 mL a los vasos de precipitado conteniendo 200 g de sustrato y 50 mL a los que contenían 100 g. Se completó el nivel de agua requerido para garantizar la humedad de 50 %. Con estos inóculos se cargaron los biorreactores, como se muestra en la Figura 2.2.

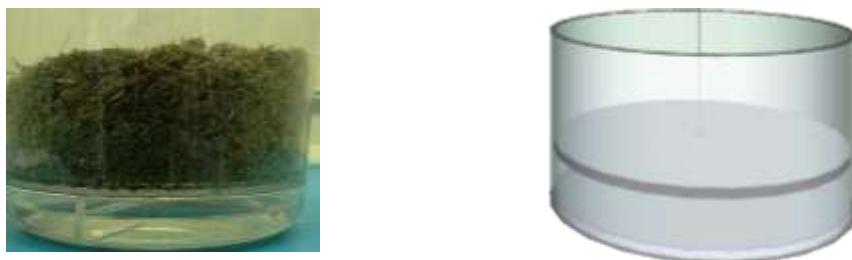


Figura 2.2 Biorreactor para la fermentación en fase sólida de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34).

2.4 Fermentación sólida

El sustrato y el inóculo preparado previamente se mezclaron hasta lograr una homogeneidad lo más alta posible. Para el desarrollo de los experimentos se diseñó un biorreactor en fase sólida del tipo cama empacada, tal y como se muestra en la Figura 2.2. El flujo de aire fue de 2 v.kg.m. (L de aire por kg de medio por min). El proceso de cultivo del hongo fue de 7 días, durante el cual se realizó la toma de muestras cada 12 horas, garantizando la representatividad de esta. Los pasos para la realización del análisis de las muestras se describen en la Figura 2.3.

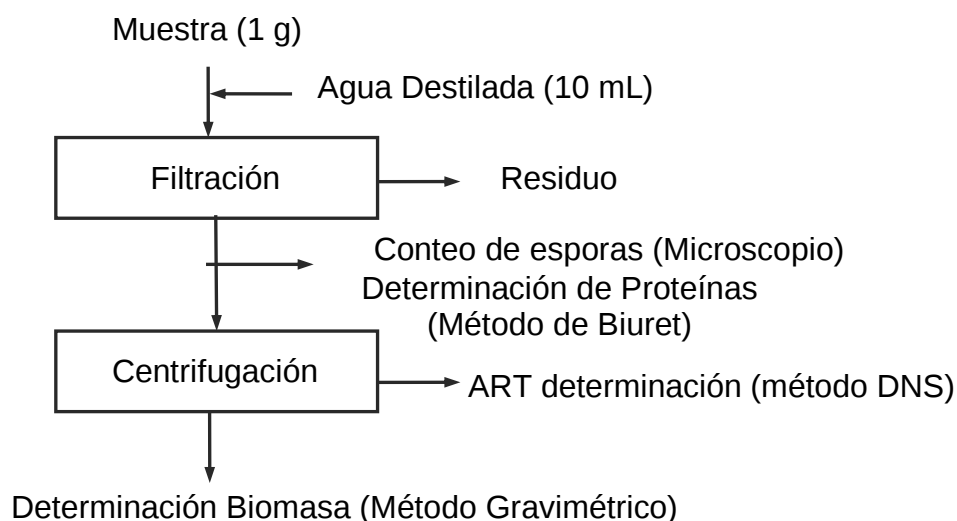


Figura 2.3 Esquema representativo del análisis de las muestras

2.5 Descripción de los biorreactores

La fermentación se llevó a cabo en equipos tipo biorreactor de cama empacada (Figura 2.4), diseñados y construidos por el equipo de trabajo. Se usaron 6

biorreactores del mismo modelo solo que con diferencia en las capacidades. Para la construcción de estos equipos se emplearon 6 vasos de precipitado, 3 de 5 L y 3 de 2 L. Las camas estaban suspendidas sobre una base de acrílico con 32 orificios por donde se distribuyó el flujo de aire húmedo suministrado en el fondo del biorreactor. El aire proveniente del compresor contaba con una línea de distribución compuesta por una válvula principal, un distribuidor de 6 líneas y una válvula en cada línea a la entrada del equipo para controlar el flujo de aire necesario en la fermentación.

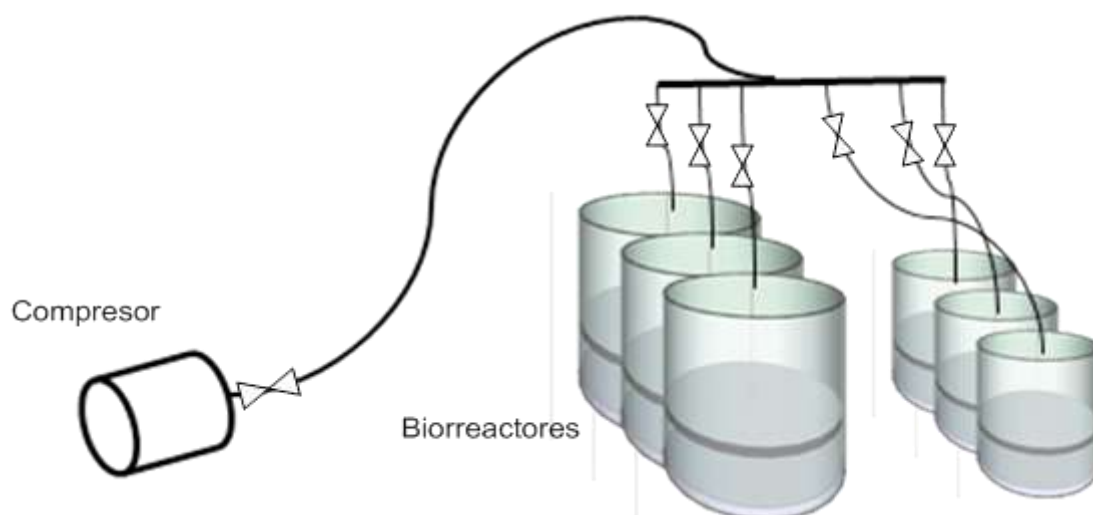


Figura 2.4 Representación de la estación experimental

2.6 Diseño experimental y procesamiento estadístico

2.6.1 Selección de la escala

Para evaluar el comportamiento del crecimiento del *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en las escalas utilizadas se empleó el método de comparación de medias mediante un análisis de varianza simple (ANOVA) a $p \leq 0,05$, donde la variable independiente es la escala empleada.

X_1 : Escala (100 g y 200 g del sustrato)

Variables dependientes:

Y_1 : Conteo celular (cél/g de sustrato)

Y_2 : Concentración de proteínas (mg/g sustrato)

Y₃: Cantidad de biomasa (mg cél/g sustr)

Y₄: Concentración de ART (mg/g de sustrato)

Y₅: Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)

Y₆: Productividad (g/L·h)

Los datos se procesaron con el programa Statistica (StatSoft Inc.) versión 12.0 (2014).

2.6.2 Selección del modelo matemático para la descripción del crecimiento

Para seleccionar el modelo matemático que mejor ajuste los datos del crecimiento celular de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34), se buscaron los modelos de mayor aplicación y de menor complejidad (Cayre et al., 2001). Se probaron varios modelos usando el programa OriginPro (OriginLab Inc.) versión 9.0 (2012), en el que se pueden seleccionar varias ecuaciones matemáticas dentro de la categoría de crecimiento microbiano. Para determinar la normalidad de los residuos se empleó el test de Kolmogorv-Smirnov para $p \leq 0,05$.

Los modelos seleccionados se muestran en la Tabla 2.1 con la ecuación según la forma que aparece en el programa y la modificación del modelo para incluir los parámetros de significado biológico (Zwietering et al., 1990).

Tabla 2.1 Ecuaciones de los modelos matemáticos aplicados

Modelos	Ecuación	Modificación	Parámetros
Gompertz	$y = ae^{(-e^{(-k(x-x_c))})}$	$y = Ae^{\left\{-e^{\left[\frac{\mu_m}{A}(\lambda-t)+1\right]}\right\}}$	$\lambda = x_c - \frac{1}{k}$ $\mu_m = \frac{A \cdot k}{e}$
Richards	$y = a\{1 + (d - 1)e^{[-k(x-x_c)]}\}^{\frac{1}{1-d}}$	$y = A\{1 + ve^{(\mu_m(\tau-t))}\}^{(-\frac{1}{v})}$	$\mu_m = k$ $v = d - 1$
Logistic	$y = \frac{a}{1 + e^{-k(x-x_c)}}$	$y = \frac{A}{1 + e^{\left[\frac{4}{a}\frac{\mu_m}{A}(\lambda-t)+2\right]}}$	$\mu_m = \frac{A \cdot k}{4}$ $\lambda = x_c - \frac{2}{k}$

Donde:

- a, k, xc y d: parámetros de los modelos dados por el programa

- y: variable dependiente, equivalente al número de células contadas expresadas en términos de biomasa producida (g células / g de sustrato)
- x: variable independiente, equivalente al tiempo de fermentación, t (h)
- A: es el valor asintótico cuando el tiempo decrece indefinidamente (aproximadamente equivalente al logaritmo del número inicial de microorganismos)
- μ_m : tangente en el punto de inflexión de la curva de crecimiento, equivalente a la velocidad de crecimiento máximo del microorganismo (h^{-1})
- λ : frecuencia, intersección de esta tangente con el eje x

2.6.3 Efecto del *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en la producción de frijol caupí

Para el experimento desarrollado en campo se empleó un diseño de Parcelas Divididas o Cuadrado Latinos con 3 factores y 3 niveles, donde los factores son el tipo de variedad de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Los niveles estuvieron relacionados con el tipo de tratamiento a que fueron sometidas las semillas.

Factores:

V-1 : Frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp., variedad INIFAT 93-1

V-2 : Frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp., variedad IPA 207

V-3 : Frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp., variedad IPA 206

Niveles:

T-1 : Semillas de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. sembradas según el procedimiento descrito en Alfonso et al. (2000) sin adición de *Trichoderma* (TControl).

T-2: Semillas de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. sembradas según el procedimiento descrito en Alfonso et al. (2000) con adición de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) obtenido mediante la tecnología artesanal del Ministerio de la Agricultura (TMINAG).

T-3: Semillas de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. sembradas según el procedimiento descrito en Alfonso et al. (2000) con adición de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) obtenido mediante fermentación sólida sobre bagazo de caña en el presente trabajo (TFS).

En los casos en que se aplicó el preprado de *Trichoderma* se realizó el tratamiento a la semilla y un tratamiento de en siembra. La inmersión de la semilla se realizó durante 10 min a razón de 20 g/L antes de la siembra. El tratamiento en siembra se llevó a cabo en el suelo, a razón de 20 g/L y una solución final de 400 L/ha (González et al., 2005).

Se procesaron los datos con el programa Statistica (StatSoft Inc.) versión 12.0 (2014).

2.7 Concentración de esporas (Conteo en Cámara de Neubauer)

Se hacen diluciones del cultivo hasta una densidad celular que permita un buen conteo de las células al microscopio óptico (Márquez Gutiérrez et al., 2010).

La concentración de conidios se determinó mediante la expresión:

$$C = K \cdot N \cdot D \quad (2.1)$$

Donde:

- C: concentración de conidios (esporas o conidios / mL).
- K: constante de la cámara ($5 \cdot 10^4$ para la cámara de 25 cuadrantes).
- N: cantidad de esporas contadas en los 5 cuadrantes de la cámara.
- D: cantidad de diluciones sucesivas.

2.8 Determinación de proteínas totales

Las determinaciones se realizaron por el método de Biuret (Gornall et al., 1949, Jernejc et al., 1986) descrito en el Anexo 1 del presente trabajo. Se realizaron mediciones de absorbancia para concentraciones de proteínas conocidas con las que se trazó una curva patrón. Con esta se realizó la determinación de la concentración de cada muestra. Se obtuvo la ecuación 2.2 para la estandarización de la curva patrón de absorbancia a diferentes concentraciones de proteínas:

$$\text{Conc. P} = 158.81 \cdot A \quad (2.2)$$

Donde:

- Conc. P: Concentración de proteínas (mg/mL)
- A: Absorbancia

Con una regresión lineal $R^2 = 0,998$ que muestra un adecuado ajuste de los datos de la curva.

A 50 μL de la muestra se le añadió 3 mL de solución reactivo de Biuret. Se agitó y dejó en reposo a temperatura ambiente durante unos 15 minutos. Se leyó la absorbancia contra el blanco a 530 nm.

2.9 Determinación de la concentración de azúcares reductores en el extracto

Para determinar la concentración de los azúcares reductores, se aplicó el método colorimétrico o método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959) descrito en el Anexo 2 del presente trabajo. Durante el desarrollo de este método se realizaron mediciones a diferentes valores de concentración de glucosa conocidos, se trazó una curva patrón con los datos conocidos y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{Conc.G} = 0.9235 \cdot A \quad (2.3)$$

Donde:

- Conc.G: concentración de azúcares reductores en g/L
- A: Absorbancia

Con una regresión lineal $R^2 = 0,9992$ que muestra un buen ajuste de los datos de calibración.

A 1 mL de la muestra se añadió 1mL de DNS y se agitó. Se colocó en un baño de agua a 100 °C durante 5 minutos. Luego se enfrió y se añadió 5 mL de agua destilada teniendo cuidado de homogenizar la muestra antes de leer en el espectrofotómetro a 530 nm.

2.10 Determinación de biomasa

La biomasa se calculó por el método gravimétrico. Primeramente se centrifugaron 5 mL del extracto de *Trichoderma harzianum* Rifai (A- 34) a 3000 rpm durante 20 min. Se extrajo el sobrenadante y se secó en la estufa el precipitado hasta lograr un peso constante. Se pesó para determinar la cantidad de biomasa (g células) por la diferencia de peso entre el tubo seco limpio y el tubo que contenía sedimento secado en la estufa.

2.11 Determinación del pH y humedad del cultivo

El pH se midió en forma directa con pH-metro (Modelo PHSJ-4A) al extracto obtenido para tener una referencia del comportamiento de este parámetro durante el proceso. La humedad se determinó por la Ec. 2.4.

$$\%Humedad = \%H = \frac{(MH - MS)}{MH} \times 100 \quad (2.4)$$

Donde:

- MH: es el peso de la muestra húmeda
- MS: es el peso de la muestra seca

2.12 Velocidad específica de crecimiento

Mediante relaciones existentes en la fase de crecimiento exponencial en microorganismo se obtiene la (Ec. 2.5), para determinar la velocidad específica de crecimiento.

$$\mu_m = \frac{\ln X - \ln X_0}{t - t_0} \quad (2.5)$$

Donde:

- X: concentración celular (células/g de sustrato)
- X₀: concentración celular inicial (células/g de sustrato)
- t : tiempo de cultivo (h)

2.13 Productividad de biomasa

Para evaluar el desempeño del proceso se determinó la productividad por la Ec. 2.6.

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (2.6)$$

Donde:

- P_x : productividad en biomasa (mg cél/g sustr.h)
- X_m : concentración celular máxima (mg cél/g sustr)
- X_0 : concentración celular inicial (mg cél/g sustr)
- t_f : tiempo del cultivo cuando la biomasa es máxima (h)

2.14 Actividades de campo

Los experimentos de campo se desarrollaron en la Unidad de Extensión, Investigación y Capacitación Agraria de la provincia de Holguín (UEICA-H), situado en el poblado de Velasco, municipio de Gibara. El área experimental es de 216 m², dividida en 9 parcelas de 24 m² y las siembras se realizaron a 90 x 15 cm con un total de 80 semillas por surco.

La parcela se ubicó mediante los datos de GPS (Dispositivo inteligente, Alcatel One Touch Pop1) como se muestra en la Tabla 2.2

Tabla 2.2 Datos de localización de la Parcela

Latitud	N 21° 03. 868°
Longitud	W 76° 20. 139°
Altitud	74 m
Precisión	2,4 m
Declinación	352°

2.15 Caracterización del suelo

El experimento se desarrolló en un suelo pardo con carbonatos, donde se realizó un análisis químico-físico a varias profundidades de 5 cm, 10 cm, 20 cm y 30 cm

de dos horizontes (Anexo 3). Los análisis físico-químicos fueron realizados por la UEB “Geominera de Oriente” en Santiago de Cuba

2.16 Cultivo utilizado

El cultivo empleado para la investigación fue el frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Se realizó la prueba estándar de germinación en la UEICA-H.

Tabla 2.3 Germinación de semillas de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. obtenida en gabinete

Variedades	Germinación en gabinete (%)
INIFAT 93-1	98
IPA 207	75
IPA 206	98

En la Tabla 2.4 se muestran los principales equipos empleados durante el desarrollo de la investigación.

Tabla 2.4 Equipos utilizados durante el desarrollo experimental

Autoclave	Medexport, “BK-75”, URSS Presión de trabajo 2.2 kgf/cm^2 Presión de prueba 4.5 kgf/cm^2 Temperatura admitida en las paredes de la vasija 135°C 3 Hz :220/330 V :6 KW
Balanza analítica digital	Sartorius, “MP 120-1”, Japón Capacidad 120 g/ 0.001g
Baño termostato	“BT-2002”, Japón
Espectrofotómetro	VIS – 723G, China
Microscopio	N 800-M, China
Centrífuga	URSS, 1982 velocidad máxima 5000 rpm
Compresor	Puska S.A. Presión: 10 Bar Cap:100 L Tmáx:100 $^\circ\text{C}$ Tmín:10 $^\circ\text{C}$
Centrífuga	“JANETZKI” T-5
pH-metro	Modelo PHSJ-4A. China.
Pie de Rey	USA

Capítulo 3. Análisis y discusión de los resultados

3.1 Valoración de las tecnologías existentes en la producción de *Trichoderma harzianum*

En el mundo se realizan pequeñas producciones de agentes de control biológico, y en menor cantidad sobre soporte sólido, pues en este tipo de fermentación los parámetros que rigen el proceso de reproducción y crecimiento microbiano como temperatura, pH, etc., son difícil controlarlas. Las condiciones que proporcionan las fermentaciones sobre soporte sólido de ser semejantes a las condiciones donde estos microorganismos se desarrollan en estado natural, proporcionan una gran ventaja facilitando la adaptación del microorganismo (Stefanova et al., 1999a, Stefanova et al., 1999b).

Los métodos de producción de *Trichoderma* en los centros de reproducción varían considerablemente. Muchos están basados en fermentaciones sobre sustrato sólido con granos de cereales donde el arroz es el más universal. Otros usan sustratos no nutritivos como arcilla. Otras tecnologías se desarrollan en tanques de fermentación para obtener productos a base micelio, blastosporas o conidios sumergidos (Fernández-Larrea, 2001). Actualmente no existen grandes producciones de los preparados por fermentación de estos hongos, ya que los métodos existentes son artesanales, produciendo bajas cantidades de biomasa y sin dar respuesta a la demanda de estos productos, que cada día aumenta por los beneficios que su aplicación trae al medio ambiente y a los cultivos (Más-Diego et al., 2013).

3.2 Efecto del cambio de escala en el consumo de azúcares reductores (ART)

En la Figura 3.1 muestra la variación de los ART en el transcurso del tiempo

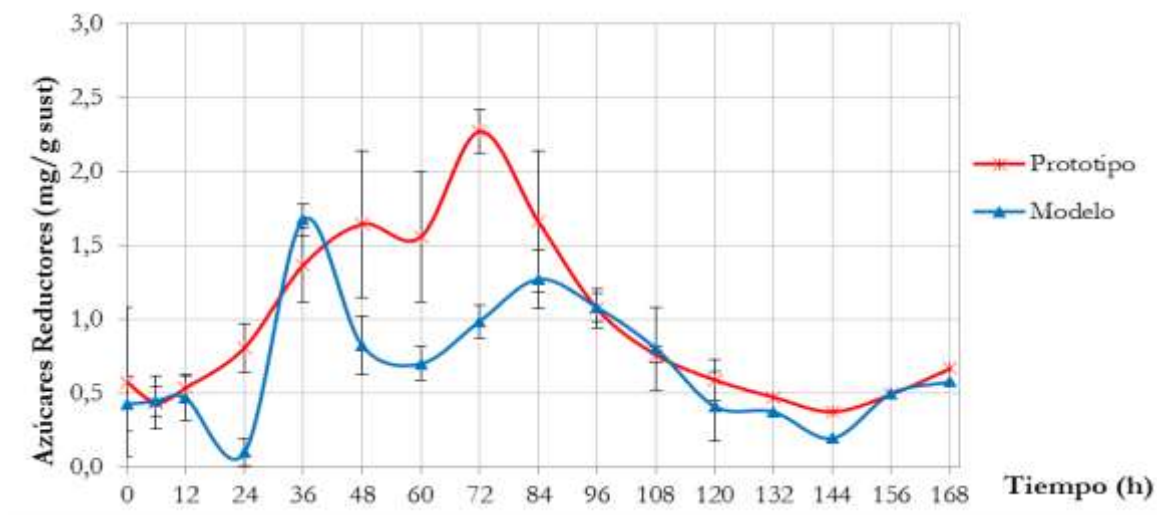


Figura 3.1. Efecto del cambio de escala en el consumo de ART. Prototipo: Biorreactor de 200 g, Modelo: Biorreactor de 100 g.

La concentración de ART se encontraba inicialmente entre 0,4247 y 0,5724 mg/g sustrato para el modelo y el prototipo respectivamente. Con el curso del tiempo fue aumentando logrando alcanzar mayores valores de concentración en las 72 horas de fermentación para el prototipo y a las 36 horas para el modelo. Posteriormente el microorganismo experimenta su fase de crecimiento exponencial y comienza a consumir los ART presentes.

El incremento de los ART inicialmente puede estar asociado a la degradación del sustrato. La acción de las enzimas producidas por *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) dentro de ellas las celulasas que son capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos internos β -1,4 de la celulosa a través de la acción conjunta de otras enzimas, generando dímeros de celobiosa como producto de su hidrólisis y pequeñas cantidades de glucosa. Las moléculas de celobiosa obtenida se hidrolizan a monómeros de glucosa (Lynd et al., 2002, Acevedo et al., 2014). De esta forma, los microorganismos pueden usar los productos generados por la hidrólisis como fuente de carbono (Carrillo, 2003, Rocha et al., 2013, Rocha et al., 2016). A partir de aproximadamente las 84 horas en adelante los valores de

concentración de los azúcares reductores comenzaron a descender como consecuencia del consumo de estos por el microorganismo.

Este suceso se encuentra relacionado con el crecimiento celular y la biomasa producida que presentan un incremento de sus valores, provocando un aumento en la actividad metabólica.

3.3 Efecto del cambio de escala en la producción de proteínas

Los valores de concentración de proteínas totales oscilaron entre 0,0268-0,0841 mg/mg de sustrato para el modelo y 0,0234 - 0,0888 mg/mg de sustrato para el prototipo, respectivamente (Figura 3.2)

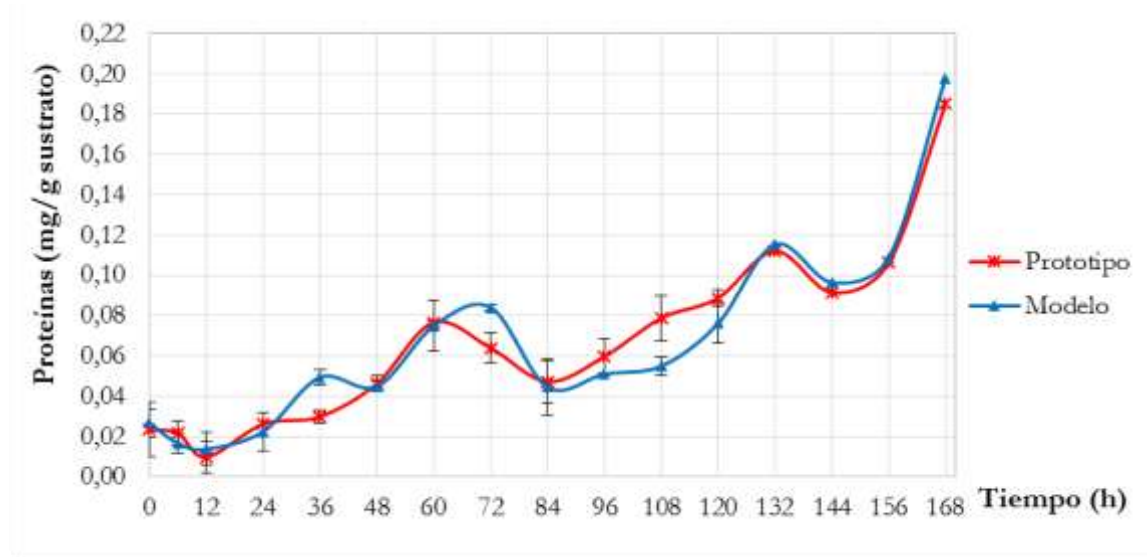


Figura 3.2 Efecto del cambio de escala en la producción de proteínas. Prototipo: Biorreactor de 200 g, Modelo: Biorreactor de 100 g.

En las primeras horas no se observaron cambios significativos para el modelo y el prototipo, pues en esta etapa el microorganismo no ha presentado un completo desarrollo de su mecanismo reproductivo, ni ha logrado adaptar su metabolismo a las condiciones de cultivo. Durante el resto del proceso se muestra un aumento en la producción de la biomasa. Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Ma et al. (2013) donde alcanzan valores de 7,28 g/L de proteínas para *Trichoderma reesei* en medio líquido compuesto principalmente por celulosa microcristalina. Esta diferencia puede estar asociada a que en medio líquido el

microorganismo se encuentra sumergido en el medio y la superficie de las células se encuentra en contacto directo con los nutrientes. En la fermentación en fase sólida se reporta la existencia de gradientes en la concentración de nutrientes y oxígeno, lo que, junto a la heterogeneidad de la matriz sólida, provoca variabilidad en el crecimiento microbiano y dificultad en la toma de muestras (Soccol et al., 2017).

3.4 Efecto del cambio de escala en la producción de biomasa

El valor máximo de biomasa para el modelo fue de 22,56 mg cél/g sustrato y se encontró a las 168 horas de cultivo. En el caso del prototipo los valores fueron de 22,43 mg cél/g sustrato, a las 156 horas de cultivo (Figura 3.3).

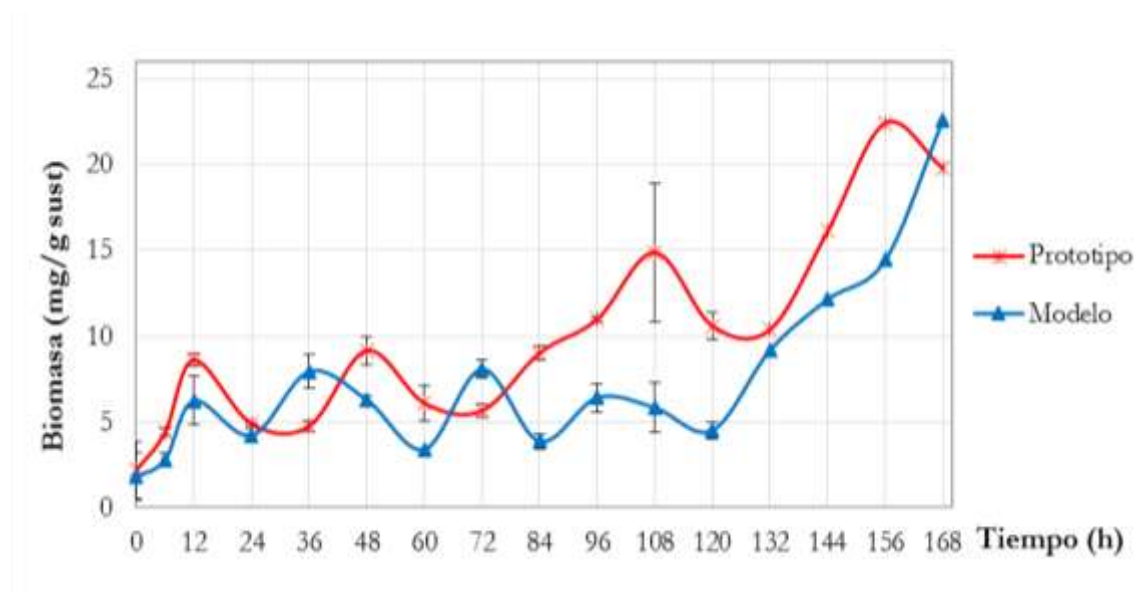


Figura 3.3 Efecto del cambio de escala en la producción de biomasa. Prototipo: Biorreactor de 200 g, Modelo: Biorreactor de 100 g.

Los valores de biomasa permanecieron aproximadamente constantes en las primeras 72 h de la fermentación. A partir de este momento la biomasa medida comienza a aumentar, tanto para el modelo como para el prototipo. A partir de la fase de despegue, el prototipo presentó un aumento de los valores de biomasa, con valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) con respecto al modelo hasta las 132 horas de cultivo. Estudios realizado por Callow et al. (2016) reportan valores $3,5 \pm 0,5$ g/L para *Trichoderma reesei* Rut (C-30) en medio líquido

estandarizado, siendo estos resultados superiores a los obtenidos en la investigación realizada en el presente trabajo. Ma et al. (2013) también obtiene resultados superiores de hasta 40 g/L de biomasa para *Trichoderma reesei* en un medio líquido, donde su principal componente es la celulosa microcristalina. Rahaeifard et al. (2013) logran valores de 4,15 g/L y 19,80 g/L en medio normal y optimizado respectivamente para *T. harzianum* en medio líquido (frascos agitados) y en un reactor de tanque agitado (16 L) hasta 25,0 g/L.

De forma general, los cultivos realizados en fermentación líquida tienen un mayor control de los parámetros y variables que rigen el proceso, mientras que en las fermentaciones en fase sólida se hace casi imposible. En los medios líquidos el microorganismo está sumergido en el medio en que se desarrolla y existe mayor transferencia de masa del medio hacia el interior de las células en contacto. Todo esto tiene influencia en el crecimiento celular y rendimientos de los demás parámetros obtenidos (Thomas et al., 2013).

Al realizar el cálculo de la productividad se obtuvieron valores (P_x) de $0,1297 \pm 0,00193$ y $0,1238 \pm 0,01407$ para el prototipo y el modelo respectivamente no mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ellos.

3.5 Análisis de la influencia del tamaño de los biorreactores en el crecimiento celular

La Figura 3.4 muestra el comportamiento del conteo celular en función del tiempo de fermentación (h) de los experimentos a dos escalas productivas. El número de células inicial fue de $2,399 \cdot 10^7 \pm 8,443 \cdot 10^5$ células/g de sustrato.

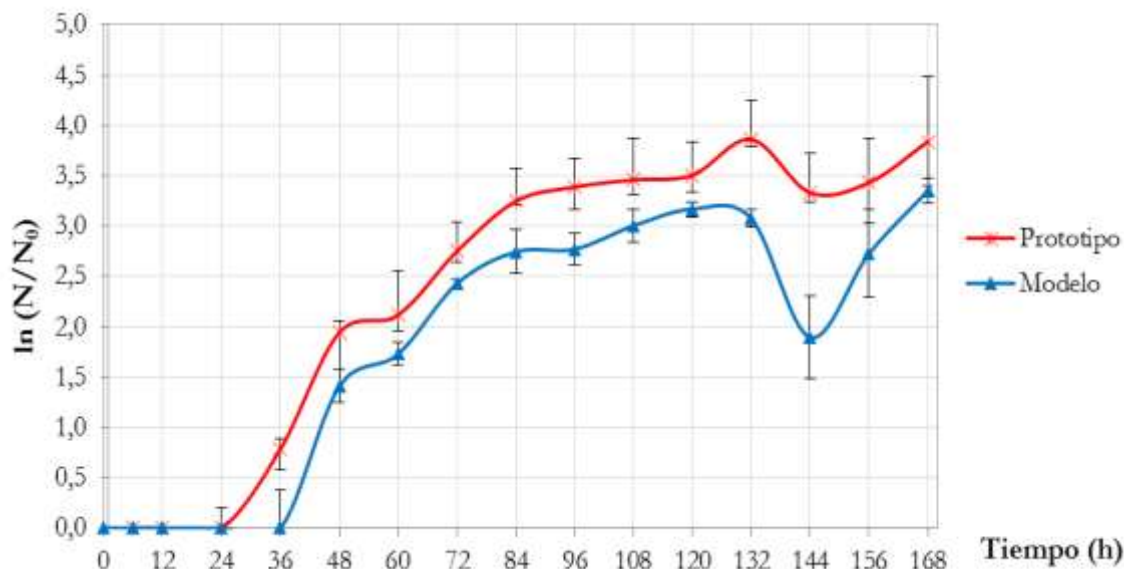


Figura 3.4 Efecto del cambio de escala en el crecimiento celular. Prototipo: Biorreactor de 200 g, Modelo: Biorreactor de 100 g.

Se alcanzaron valores finales del orden de 10^9 células/g de sustrato. El crecimiento alcanzó un valor máximo de $1,101 \cdot 10^9$ células/g de sustrato para el modelo y $1,142 \cdot 10^9$ células/g de sustrato en el prototipo transcurridas 168 h de fermentación. Los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos por Agamez Ramos et al. (2008) en la evaluación de sustratos y proceso de fermentación en fase sólida para la producción de *Trichoderma sp.* Aunque las evaluaciones se hicieron en sustratos a base de cascarilla de arroz y de semilla de algodón enriquecidos con melaza y urea, los valores de concentración de esporas se encuentran en el orden de 10^9 células/g de sustratos. Otros resultados similares son los reportados por Elósegui Claro et al. (2009) para *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34), donde obtuvieron valores del orden de 10^9 células/g de sustrato usando arroz partido y cáscara de arroz como sustrato.

El crecimiento se mantuvo durante las primeras 24 a 36 horas en un estado de latencia, debido a la adaptación del microorganismo al medio en que se desarrolló. A partir de este tiempo comenzó a incrementarse el número de células de *T. harzianum* Rifai (A-34) en los biorreactores, pero no fue hasta la hora 48 que el

crecimiento comenzó a tomar valores altos mostrando un crecimiento logarítmico. Inicialmente los biorreactores de 100 y 200 g de sustrato parten de valores semejantes durante la primera fase, en el resto del proceso el prototipo y el modelo no presentaron diferencia considerables en el crecimiento celular. Al final de la fermentación la diferencia entre el modelo de 100 g de sustrato, y 200 g de sustrato fue igual a $1,611 \cdot 10^7$ células/g de sustrato.

En la fase de crecimiento logarítmico se calculó la velocidad específica de crecimiento para cada una de las curvas, por medio de la Ec. 2.5. La variación de la velocidad específica de crecimiento mostró los mejores resultados para el prototipo de 200 g de sustrato obteniendo como máximo valor $\mu_m = 0,0471 \text{ h}^{-1}$ y $\mu_m = 0,042 \text{ h}^{-1}$ para el modelo de 100 de sustrato con una desviación estándar de $1,17 \cdot 10^4$ y $3,75 \cdot 10^4$ respectivamente. Estos resultados son semejantes a los expuestos por Rocha-Valadez et al. (2006), donde obtuvieron un valor de $\mu_m = 0,052 \text{ h}^{-1}$ para el mismo microorganismo pero en fase sumergida. Rahaeifard et al. (2013) reportan valores de velocidad máxima de crecimiento (μ_m) de $0,0452 \text{ h}^{-1}$ y $0,0504 \text{ h}^{-1}$ para *T. viride* en medio líquido. Los resultados obtenidos muestran un ligero incremento de la velocidad específica de crecimiento del prototipo con respecto al modelo, esto pudiera estar asociado a una mejor transferencia de oxígeno, calor y nutrientes del medio donde se desarrolló.

3.6 Modelación matemática del crecimiento celular de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34)

Al realizar la comparación entre los diferentes modelos matemáticos propiciados por el OriginPro para la data experimental obtenida, el modelo de Gompertz resultó ser el más adecuado para la descripción de los datos con un coeficiente de regresión (R^2) igual a 0,9852 y 0,9318 para el prototipo y modelo el respectivamente como se muestran en la Figura 3.5 y Figura 3.6. Estos resultados son similares a los obtenidos por Cayre et al. (2001) en bacterias lácticas donde emplean el modelo de Gompertz y el modelo Logístico. Estudios realizados por Cepero et al. (2013) para *Lactobacillus casei*, corroboran los resultados obtenidos para el modelo Gompertz con un ajuste superior al 95% ($p \leq 0,05$).

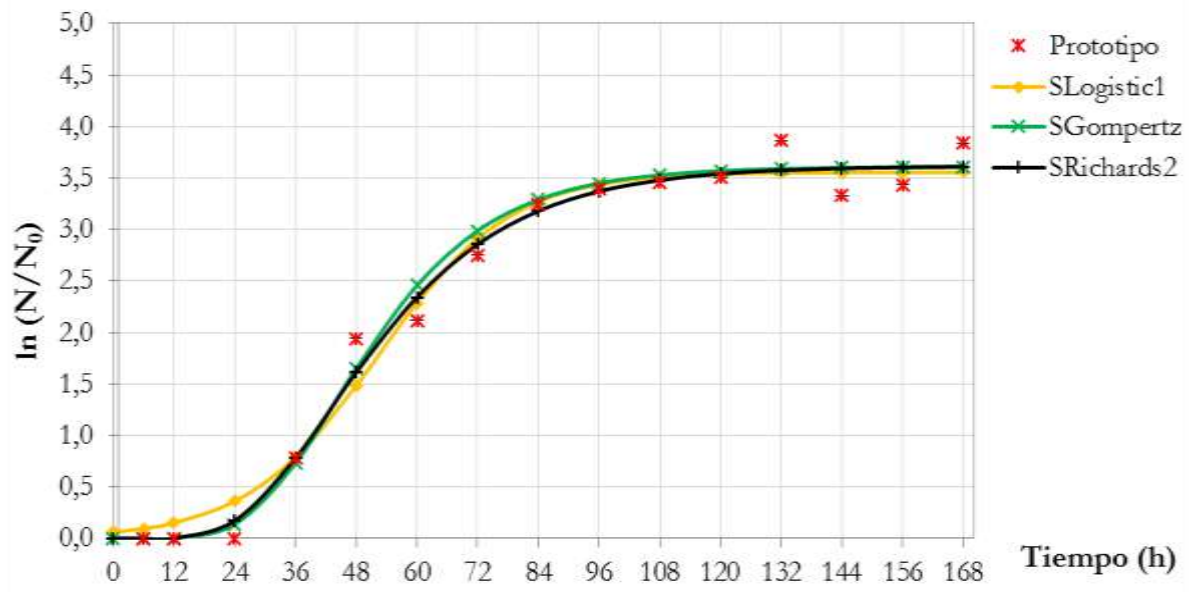


Figura 3.5 Curvas de crecimiento del prototipo ajustada con los modelos matemáticos de Gompertz, Logístico y Richards

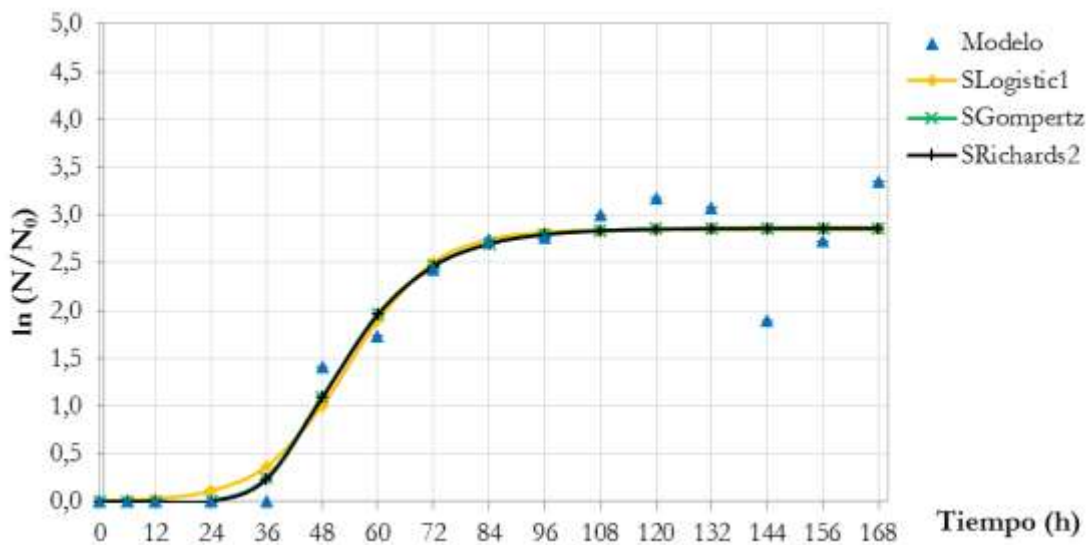


Figura 3.6 Curvas de crecimiento del modelo ajustada con los modelos matemáticos de Gompertz, Logístico y Richards

En los diferentes casos se obtuvo un buen ajuste entre los modelos. En el caso del modelo Logístico, pudiera ser que la falta de simetría de algunas curvas explicaría las mayores desviaciones entre observaciones y predicciones obtenidas puesto

que éste es una función simétrica respecto al punto de máxima velocidad de crecimiento mientras que el modelo de Gompertz no.

Realizadas las transformaciones de las variables de los modelos ajustados a los parámetros de significación biológica, se determinaron las máximas velocidades específicas del microorganismo con respecto a cada modelo usado. El modelo que mejores resultados ofrece con respecto a este parámetro cinético es el modelo de Gompertz con una máxima velocidad de crecimiento ($\mu_{\max}$) de 0,0690 y 0,0819 h^{-1} para el prototipo y el modelo respectivamente (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Valores de velocidad máxima de crecimiento obtenidos a partir de los modelos matemáticos empleados

	$\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$		R^2	
	Prototipo	Modelo	Prototipo	Modelo
Gompertz	0,0690	0,0819	0,9852	0,9318
Logístico	0,0683	0,0769	0,9780	0,9264
Richards	0,0499	0,0775	0,9846	0,9262

3.7 Factores que influyen en la fermentación

La humedad con la cual se parte inicialmente la fermentación fue con un valor de un 50 % según lo encontrado en la búsqueda bibliográfica. Al final del proceso los valores de humedad se encontraban en el rango de 30 - 40 %. Este descenso en la humedad al final del proceso, puede estar causado por el efecto evaporativo de la inyección de aire al biorreactor y por el incremento en la temperatura, generada por el calor metabólico liberado por el microorganismo durante su crecimiento.

La temperatura es un factor que tiene una gran influencia sobre el crecimiento de los microorganismos, y en fermentaciones aerobias una gran cantidad de calor es producida durante el crecimiento microbiano. De ahí que una limitación importante de los procesos de fermentación sólida es la dificultad de llevar a cabo la remoción del exceso de calor metabólico debido al bajo nivel de conductividad térmica del sustrato sólido. Por esta razón, en el presente trabajo, el aire fue empleado como un método indirecto para realizar un control de la temperatura a través de todo el proceso de fermentación sólida (Chen, 2013a).

El pH medido al extracto muestra la oscilación de los valores, encontrándose en el rango aproximado entre 4,67 y 6,00.

3.8 Efecto de los diferentes tratamientos en el estado de emergencia de los cultivares de frijol

La viabilidad de la semilla es reconocida como una de las variables de mayor importancia cuando se evalúa el comportamiento de un cultivo en las nuevas condiciones expuestas. El mismo demuestra el grado de conservación y está relacionado con el porcentaje de germinación y la emergencia de las semillas utilizadas en las condiciones experimentales. El porcentaje de germinación (%) de las semillas es reconocido como una de las variables de mayor importancia cuando se evalúa el comportamiento agro-productivo de un cultivo en campo y demuestra el grado de conservación de las semillas (Peña, 2015).

En la Figura 3.7 se muestran los resultados para la emergencia de cada variedad y los diferentes tratamientos aplicados al cabo de 7 días.

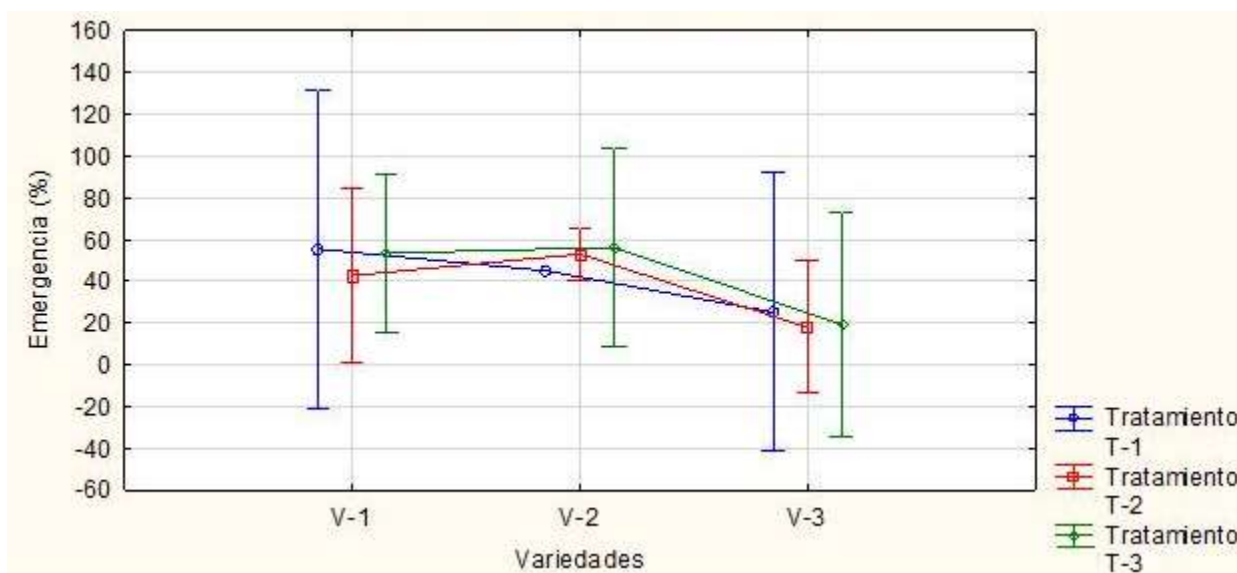


Figura 3.7 Comportamiento de la emergencia en las variedades V-1 (INIFAT 93-1), V-2 (IPA-207), V-3 (IPA-206) con los tratamientos T-1 (TControl), T-2 (TMINAG), T-3 (TFS).

Los resultados obtenidos evidencian diferencias entre las V-1(INIFAT-93-1) y V-2(IPA-2007) con respecto a la V-3 (IPA-2006) para los diferentes tratamientos,

mostrando que entre las variedades V-1 y V-2 no existe diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ellas. La variedad V-2 mostró los mejores resultados para el tratamiento T-3, con un incremento de 11,25 % respecto al tratamiento T-1 y de 3,25 % con respecto al tratamiento T-2. Al analizar la V-3 con respecto a las demás variedades se puede apreciar que fue la que peores resultados presentó obteniendo resultados de 19,25 %, 18,00 % y 25,25 % para los tratamientos T-3, T-2 y T-1, respectivamente. La variedad V-2 muestra el mejor resultado para el tratamiento T-3 con 56,25 % de emergencia y una superioridad de 3,25 y 9,25 para el tratamiento T-2 y T-1, respectivamente. Estos resultados tienen similitud con los realizados por Coelho et al. (2010) quienes evaluando la germinación de 26 genotipos de frijol criollo en condiciones de laboratorio utilizando la metodología de papel germitest, encontraron entre 37 y 100 % de germinación. Garcès Fiallos et al. (2012) reportan desde 58 % hasta 84 % de emergencia para germoplasma de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). La baja emergencia de las semillas empleadas en el experimento realizado puede estar asociada a las características genéticas y fisiológicas, además podría deberse a las condiciones de almacenamiento de la semilla y las condiciones climáticas.

3.9 Efecto de los tratamientos en la altura de las plantas de los cultivares de frijol

El crecimiento es un proceso irremisible que consiste en el aumento de tamaño de la planta, y se debe a la formación de nuevas células en ciertas regiones localizadas llamadas meristemos, así como al aumento en tamaño de las células ya formadas. La velocidad de crecimiento de una planta o de un órgano varía con la edad, siendo muy lento al principio, más rápido después y decreciendo fuertemente al final o anulándose incluso. La altura de la planta y el desarrollo vegetativo son características genéticas propias de la variedad que interactúa con el medio ambiente, y es el resultado del número de nudos y la longitud de entrenudos en el tallo (Singh, 2005). Las condiciones ambientales influyen en la expresión del crecimiento, por lo que en diferentes ambientes una variedad puede manifestar diferencias en la expresión de este carácter (Hernández, 2012b, Guillén, 2016).

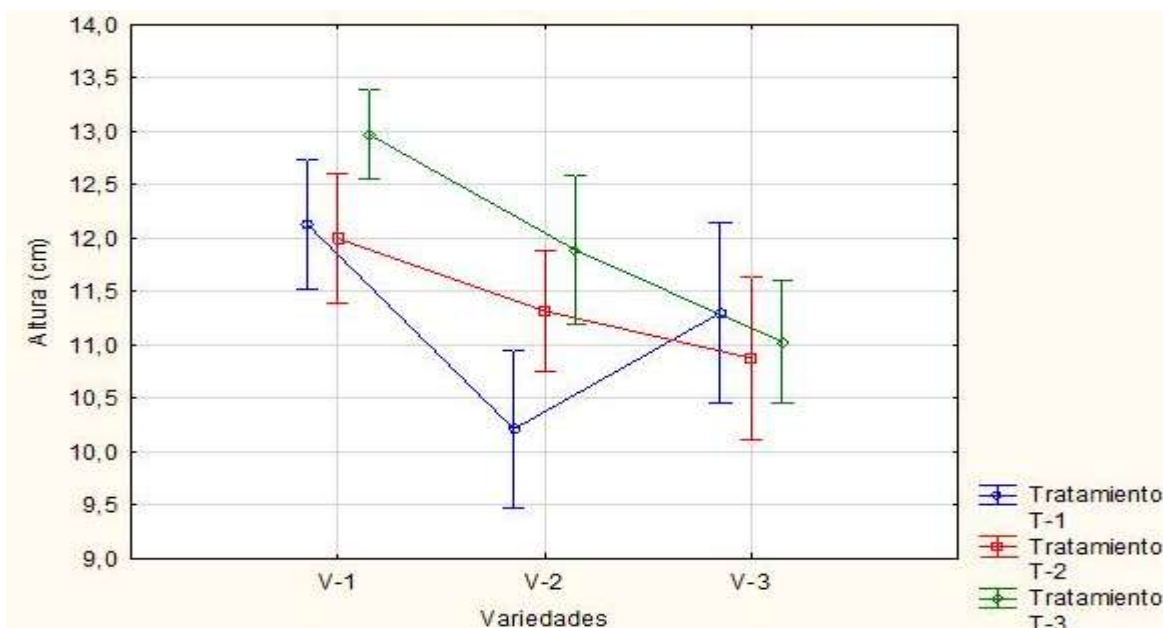


Figura 3.8 Comportamiento de la altura de las variedades V-1 (INIFAT 93-1), V-2 (IPA-207), V-3 (IPA-206) con los tratamientos T-1 (TControl), T-2 (TMINAG), T-3 (TFS).

En la Figura 3.8 se muestra la interacción existente entre la altura de las plantas de cada variedad y los tratamientos. Los mejores resultados están enmarcados para la variedad V-1 y el tratamiento T-3 donde se muestran mayores resultados con respecto a V-2 y V-3 y sus tratamientos respectivamente. En el caso de la variedad 2 se evidencian los mejores resultados para el tratamiento T-3, no siendo así para la variedad 3 donde su mejor resultado es el tratamiento T-1. Estos resultados son menores que los reportados por Garcès Fiallos et al. (2012) para germoplasma de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con valores promedios entre 38,4 y 47,7 cm. López Salinas et al. (2007a) reportaron resultados de hasta 50 cm de altura en México en el cultivar Negro Papaloapan a los 42 días. Esta variedad tiene un hábito de crecimiento indeterminado y erecto y es una planta arbustiva tipo II. Las diferencias obtenidas están relacionadas con la realización de las mediciones en el presente estudio a los 19 días.

El comportamiento diferenciado de los resultados es un reflejo de la respuesta de los biotipos a las condiciones ambientales y una expresión de las características individuales de la amplia biodiversidad en estudio, además puede ser una muestra

de la respuesta de estas variedades a la incidencia del efecto de salinidad en el suelo donde se realizó el experimento teniendo en cuenta que según Zhu (2001), el efecto más común de la salinidad sobre las plantas es la reducción del desarrollo debido a una disminución del potencial osmótico del medio y, en consecuencia del potencial hídrico del suelo. Otros factores influyentes sobre este aspecto pueden ser los factores agroclimáticos y el potencial del material genético usado en la investigación.

3.10 Efecto de los tratamientos en el diámetro de las plantas de los cultivares de frijol

Al analizar el diámetro de cada una de las variedades y los tratamientos usados se observó que no existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$) según se muestra en la Figura 3.9.

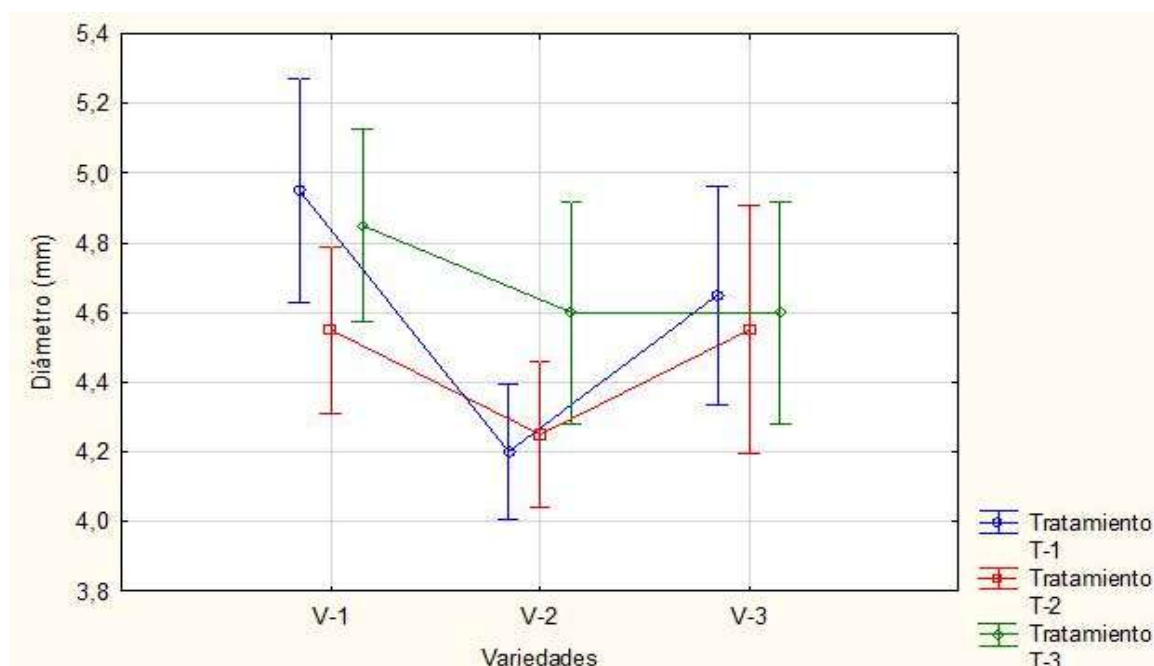


Figura 3.9 Comportamiento del diámetro de las variedades V-1 (INIFAT 93-1), V-2 (IPA-207), V-3 (IPA-206) con los tratamientos T-1 (TControl), T-2 (TMINAG), T-3 (TFS).

Los resultados obtenidos oscilaron entre 4,95 mm y 4,2 mm para T-1, 4,55 mm y 4,25 mm para T-2, 4,85 mm y 4,26 mm para T-3 como máximo y mínimo valor respectivamente. Con respecto a las variedades la mayor variación se encuentra

en las variedades V-1 con 4,95 mm y 4,55 mm, para V-2 4,6 mm y 4,2 mm como máximo y mínimo valor obtenido. Estos resultados son menores que los expuestos por Hernández (2012b) para la evaluación de 19 líneas de frijol caupí donde reportan $8,078 \pm 0,794$ mm como promedio sin presentar diferencias significativas. En esta investigación no utilizan ninguna de las variedades utilizadas en la investigación presente y las mediciones fueron realizadas a los 56 días.

3.11 Efecto de los tratamientos en el número de vainas de las plantas de los cultivares de frijol

Esta variable indica cómo se ha comportado el aprovechamiento eficiente de los nutrientes por la planta, entre ellos el nitrógeno, hasta esta etapa de su ciclo de vida. En la etapa reproductiva la planta pone en movimiento las reservas de nutrientes disponibles en sus fuentes, si en esta etapa no dispone de las suficientes recurre a mecanismos que implican la reducción del número de vainas, del tamaño de las semillas y por consecuencia del rendimiento, por ello, el número de vainas es el resultado de la nutrición mantenida por la planta durante sus diferentes fenofases (Medina et al., 1996a, Palacios and Montenegro, 2006, Ávila-Serrano et al., 2010).

El número de vainas por planta (V/P) es un carácter que está determinado por la influencia de las variables ambientales y las condiciones de desarrollo en particular, además de tener un componente genético variado, siendo cada variedad específica para esta condición (Palacios and Montenegro, 2006).

Los resultados obtenidos oscilan entre 9 y 17,6 V/P no mostrando diferencias significativas para las variedades y los tratamientos aplicados (Figura 3.10).

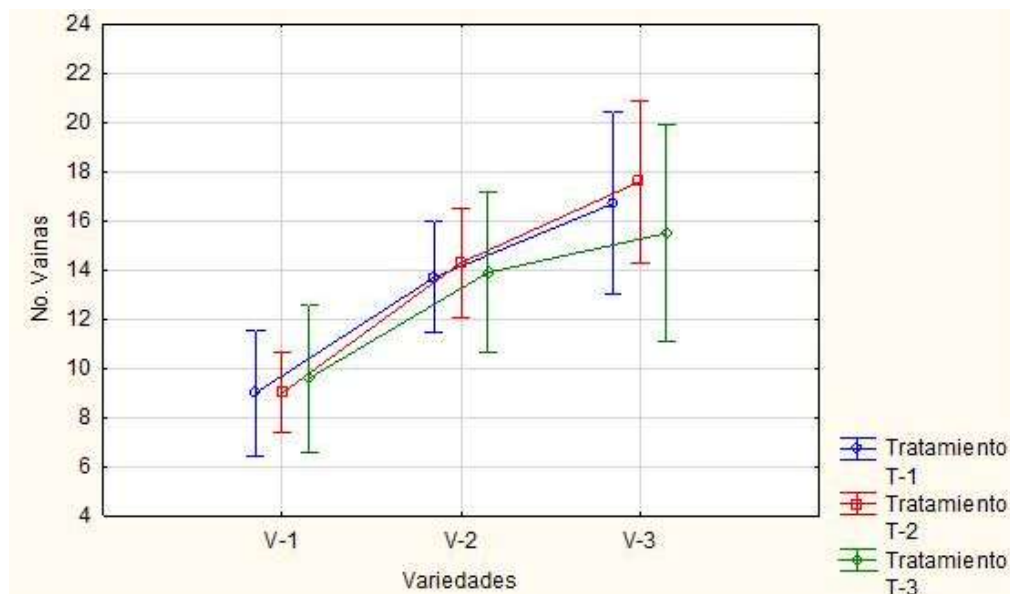


Figura 3.10 Comportamiento del número de vainas de las variedades V-1 (INIFAT 93-1), V-2 (IPA-207), V-3 (IPA-206) con los tratamientos T-1 (TControl), T-2 (TMINAG), T-3 (TFS).

Estos resultados concuerdan con lo expuestos por Ponce et al. (2003) quienes obtuvieron resultados entre 4,7 a 12,1 V/P con la caracterización de una amplia colección de frijoles. Fandiño (2009) en estudios de variedades refiere valores entre 12 y 14 V/P. Resultados semejantes a estos son los expuestos por Aramendiz and Espitia (2011) donde alcanzan valores de 12 V/P y hasta 21, 20 y 19 V/P como mejores resultados para el frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Los resultados antes expuestos muestran como la variedad 3, a pesar de poseer aspectos negativos en otras áreas como la emergencia y el tamaño de la plantas, tiene buen índice de productividad al ser la de mayor vainas por plantas.

3.12 Efecto de los tratamientos en el número de semillas por vainas de las plantas de los cultivares de frijol

Los mejores resultados para el número de semillas por vaina (S/V) se reportan para la variedad 2 con 14 S/V, no mostrando diferencia significativa con respecto a la variedad tres y los tratamientos 2 y 3 (Figura 3.11).

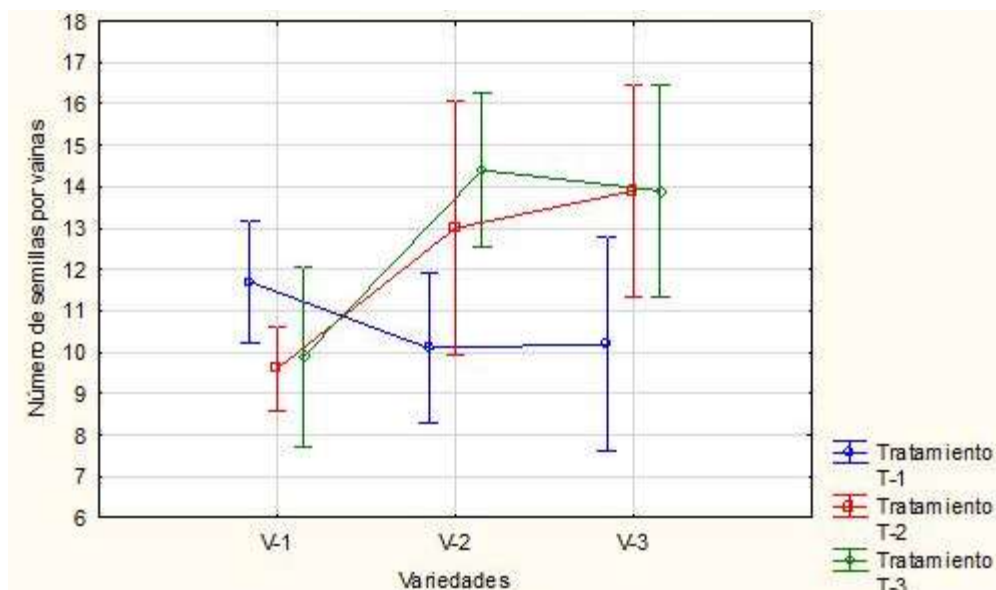


Figura 3.11 Comportamiento número de semillas por vaina de las variedades V-1 (INIFAT 93-1), V-2 (IPA-207), V-3 (IPA-206) con los tratamientos T-1 (TControl), T-2 (TMINAG), T-3 (TFS).

En el caso de la variedad 1 los mejores resultados se obtienen para el tratamiento 1. Resultados semejantes reportan Aramendiz and Espitia (2011) con valores entre 9 y 11,9 como mínimo y máximo para *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Estos resultados son superiores a los estudios realizados por Fandiño (2009) quien para la variedad de frijol Velasco Largo obtiene un rango de valores en siete localidades evaluadas de 4 a 5 S/V.

Dado que el mayor tamaño y masa de las semillas se obtiene en el punto de madurez fisiológica y está relacionado con el vigor y la pureza varietal (Palacios and Montenegro, 2006) se determinó el valor de la masa de 100 semillas (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Masa promedio de 100 semillas de frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Variedades	Tratamientos	Masa promedio de 100 semillas (g)
V-1	T-1	17,65
V-1	T-2	14,58
V-1	T-3	17,77
V-2	T-1	15,50
V-2	T-2	18,79
V-2	T-3	16,86
V-3	T-1	22,31
V-3	T-2	22,38
V-3	T-3	22,79

El valor de la masa de 100 semillas oscila entre 14,58 y 22,79 gramos/100 semillas como mínimo y máximo valor y en el caso de peso de semillas por plantas los resultados oscilaron entre 19,63 y 41,88 gramos/plantas, siendo los mejores resultados para los tratamientos T-3 en el caso de las tres variedades con valores de 23,83 para V-3, 37,91 para V-2 y 41,88 para V-1. Ávila-Serrano et al. (2010) obtuvo resultados similares para 5 variedades de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. con valores entre 17,40 y 27,30 g/100 semillas y 13,66 y 21,88 g/plantas.

3.13 Rendimientos de los cultivares de frijol

Los mejores resultados fueron los obtenidos para las variedades 1 y 2 (Tabla 3.3), que fueron durante todo el proceso productivo las que evidenciaron los mejores resultados para las otras variables agronómicas evaluadas. El cálculo del rendimiento se realizó teniendo en cuenta la cantidad de plantas por metro, los valores promedios de número de vainas por plantas, granos promedio por plantas y el peso promedio de cada semilla.

Tabla 3.3. Rendimiento de las variedades V-1, V-2 y V-3 para los tratamientos T-1, T-2 y T-3

	Rendimiento (t/ha)	Rendimiento (kg/ha)
V-1 T-3	2,79	2792,23
V-1 T-2	2,64	2640,58
V-2 T-3	2,53	2527,35
V-2 T-2	2,34	2341,10
V-1 T-1	1,97	1972,80
V-2 T-1	1,86	1861,54
V-3 T-3	1,59	1588,56
V-3 T-1	1,53	1528,11
V-3 T-2	1,31	1308,56

Los resultados obtenidos tienen similitud con lo obtenidos por da Costa et al. (2008) en Brasil (2843,00 - 2022,00 kg ha⁻¹) y son mejores que los obtenidos por López et al. (2001) en México (1321 - 400 kg ha⁻¹). Otras investigaciones realizadas por Garcès Fiallos et al. (2012), reportan rendimientos entre 962,59 y 1401,54 kg ha⁻¹ en la variedad (INIAP-473) y Salinas et al. (2008) con valores que oscilaron entre 0,6 y 3,95 t/ha para 24 genotipos. Otros estudios realizados por López Salinas et al. (2007b) obtiene 1364 kg ha⁻¹ como rendimiento promedio general para diferentes variedades de frijol negro.

3.14 Análisis económico

Para realizar el análisis económico hay que tener en cuenta todos los parámetros que influyen en el costo de producción. Entre los tratamientos que incluyen el preparado de *Trichoderma* T-2 (TMINAG) y T-3 (TFS), el tratamiento T-3 (TFS) tiene un costo de producción más bajo, pues el sustrato que se usa es de bajo costo o incluso hasta puede ser residuos industriales. Para determinar un valor aproximado de los ingresos se toma como referencia el costo de 915 pesos por un quintal de frijol negro de según Ministerio de Finanzas y Precios (2015).

Los mayores ingresos calculados se encuentran en la variedad V-1 y el tratamiento T-3 con una superioridad de \$ 624 164,61 con respecto a V-3 con T-2 que fue el de menor ingreso. (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Ingresos de las variedades V-1, V-2 y V-3 para los tratamientos T-1, T-2 y T-3.

	Rendimiento (qq/ha)	Ingresos (\$)
T-3 V-1	1283,78	1174662,28
T-2 V-1	1214,06	1110864,69
T-3 V-2	1162,00	1063230,00
T-2 V-2	1076,37	984876,55
T-1 V-1	907,03	829936,55
T-1 V-2	855,88	783130,62
T-3 V-3	730,37	668290,76
T-1 V-3	702,57	642860,07
T-2 V-3	601,64	550497,65

Las tres variedades usadas reportan los mejores resultados para el tratamiento T-3, esto puede estar asociado a la capacidad que posee *Trichoderma* como estimulador del crecimiento vegetal. El empleo de *Trichoderma* resulta ser una alternativa a tener en cuenta cuando se hable de estimulación del crecimiento y por tanto un aumento de los beneficios agrícolas y económicos. Estudios realizados por Brotman et al. (2008), Hermosa et al. (2012), Brotman et al. (2013) y Bemmeziane (2015) confirman la habilidad que posee este hongo en la interacción beneficiosa con las plantas.

Conclusiones

1. A pesar de todas las investigaciones realizadas y logros alcanzados en el desarrollo tecnológico de las fermentaciones, no existe una tecnología que avale de forma certera la producción de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) a nivel industrial. Las fermentaciones sumergidas poseen la ventaja de ser controladas con mayor facilidad, pero el caso de hongos filamentosos, la fermentación sobre soporte sólido permite obtener una mayor proporción de esporas, con características muy parecidas a las de su medio natural y una mayor tolerancia a las condiciones ambientales.
2. El proceso de fermentación sólida sobre bagazo de caña resultó ser apropiado para la producción celular, obteniendo un valor máximo de $1,101 \cdot 10^9$ células/g de sustrato para el modelo y $1,142 \cdot 10^9$ células/g de sustrato en el prototipo. La variación en la escala mostró un efecto positivo al no existir diferencias significativas entre ambos valores, brindando la posibilidad de un escalado del proceso productivo.
3. Aunque existen muchos modelos matemáticos, de los empleados en la investigación, el modelo de Gompertz resultó ser el de mejor ajuste de los datos para las diferentes pruebas estadísticas realizadas, con un coeficiente de regresión igual a 0,9852 y 0,9318 para el prototipo y modelo respectivamente. No rechaza la prueba de normalidad para el test de Kolmogorov-Smirnov y el criterio de información de Akaike da superior a los otros modelos empleados.
4. El frijol caupí *Vigna unguiculata* (L.) Walp. evaluado con *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) obtenido por fermentación sólida mostró mayor influencia en los parámetros asociados al rendimiento, trayendo consigo beneficios económicos para las variedades estudiadas.

Recomendaciones

1. Evaluar el efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) en otros cultivos.
2. Evaluar el crecimiento de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) empleando otros sustratos sólidos.
3. Evaluar otros modelos matemáticos para describir el desarrollo del microorganismo.
4. Desarrollar la estequiometría de reacción de *Trichoderma harzianum* Rifai (A-34) creciendo sobre el bagazo de caña.
5. Realizar el escalado del proceso productivo de este hongo.

Bibliografía

- ABU YAZID, N., BARRENA, R., KOMILIS, D. & SÁNCHEZ, A. 2017. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. *Sustainability*, 9, 224.
- ACEVEDO, D., GRANADOS, C. & GUERRERO, E. M. 2014. Cinética Enzimática del Bagazo de Caña para la Producción de Glucosa Utilizando la Enzima *Trichoderma longibrachiatum*. *Información tecnológica*, 25, 65-72.
- AGAMEZ RAMOS, E. Y., ZAPATA NAVARRO, R. I., OVIEDO ZUMAQUE, L. E. & BARRERA VIOLETH, J. L. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, X, 23-34.
- AGBICODO, E. M., FATOKUN, C.A., MURANAKA, S., & VISSER, R. F. F. A. L. V. D., C. G. 2009. Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishments, and future prospects. *Euphytica*, 167 (3), 353-370.
- AGBOGIDI, O. 2010. Screening six cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) for adaptation to soil contaminated with spent engine oil. *J. Environ.Chem. Ecotoxicol*, 7, 103-109.
- AL-HAZMI, A. S. & TARIQ-JAVEED, M. 2016. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 288-292.
- ALBUQUERQUE, P. 2003. *Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã*. MSc., UFSC.
- ALFONSO, C., AVILÉS, R., CHAILLOUX, M., FAURE, B., GIRALT, E., GONZÁLEZ, M., GUZMÁN, J., HERNÁNDEZ, G., MATEO, A., PÉREZ, E., POLANCO, A., SAMPEDRO, J. & REYES, S. 2000. *Guía técnica para el cultivo del frijol en Cuba*, La Habana.
- ALIYU, B. 2007. Heritability and gene effects for incorporating pubescence into cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) from *V. rhomboidea* Burt. *Euphytica*, 155, 295-303.
- APAEZ, B., ESCALANTE, J., RODRÍGUEZ, G., OLALDE, G. & RAMÍREZ, V. 2009. Frijol chino (*Vigna unguiculata* L.(Walp)) su cultivo, importancia económica y medicinal. *Alternativa*, 19, 21-26.
- APÁEZ, B. P. 2010. Crecimiento y rendimiento de frijol chino (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) bajo diferentes condiciones ambientales.
- ARAMENDIZ, H., ROBLES, J. Y CABRALES, R 2013. Caracterización del frijol caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) por su contenido de proteína. *Fitotecnia Colombiana*, 3 (2), 17-23.
- ARAMENDIZ, T., HERMES & ESPITIA, C., MIGUEL 2011. Comportamiento agronómico de líneas promisorias de frijol caupí *Vigna unguiculata* L. Walp en el Valle del Sinú. *Temas agrarios*, 16.
- ARGUMEDO-DELIRA, R., ALARCÓN, A., FERRERA-CERRATO, R. & PEÑA-CABRIALES, J. J. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 25, 257-269.
- ASAD, S. A., TABASSUM, A., HAMEED, A., HASSAN, F. U., AFZAL, A., KHAN, S. A., AHMED, R. & SHAHZAD, M. 2015. Determination of lytic enzyme activities of indigenous *Trichoderma* isolates from Pakistan. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 1053-1064.
- ÁVILA-SERRANO, N., MURILLO-AMADOR, B., ESPINOZA-VILLAVICENCIO, J. L., PALACIOS -ESPINOZA, A., GUILLÉN-TRUJILLO, A., DE LA PEÑA, R. L. & GARCÍA-HERNÁNDEZ, J. 2010. Modelos de predicción del rendimiento de grano y caracterización de cinco cultivares de frijol yorimón. *Trop. Subtrop. Agroec*, 12, 11-18.
- AZIAGBA, B. O., OKEKE, C. U., EZEABARA, C. A., ILODIBIA, C. V., EGBOKA, T. P. & OBIKA, I. E. 2016. Taxonomic Implication of Morphology of Seven Varieties of *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

- Cultivated in Awka Anambra State, South Eastern Nigeria. *American Journal of Life Science Researches*, 4.
- BABU, K. N. & PALLAVI, P. N. 2013. Isolation, identification and mass multiplication of *Trichoderma* an important biocontrol agent. *Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS)*, 4, 2320-2323.
- BANAAY, C. G. B., CUEVAS, V. C. & VERA-CRUZ, C. M. 2012. *Trichoderma ghanense* promotes plant growth and controls disease caused by *Pythium arrhenomanes* in seedlings of aerobic rice variety Apo. *Philippine Agricultural Scientist*, 95, 175-184.
- BARBOSA, M. V. & DE SOUSA, E. M. L. 2017. Biologia floral, ecologia da polinização e eficiência na produção de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. em sistemas agrícolas. *Gaia Scientia*, 10.
- BELTRÁN, M., GARCÍA HJL, RUÍZ EFH, FENECH LL, MURILLO AB, PALACIOS EA & DE, T. 2009. Nutritional potential of red dolichos, brown dolichos and cowpea for green manure produced under three tillage systems. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.*, 10, 487-495.
- BEMMEZIANE, D. 2015. *Evaluation de l'effet de l'activité Phytase de Trichoderma sur la symbiose Rhizobia – Légumineuse*. MsC. Thesis Master, Université de Montpellier.
- BERNSTEIN, N., SHORESH, M., XU, Y. & HUANG, B. 2010. Involvement of the plant antioxidative response in the differential growth sensitivity to salinity of leaves vs roots during cell development. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 1161-1171.
- BHARGAV, S., PANDA, B. P., ALI, M. & JAVED, S. 2008. Solid-state Fermentation : An Overview. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 22, 49-70.
- BROTMAN, Y., BRIFF, E., VITERBO, A. & CHET, I. 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.*, 147, 779-789.
- BROTMAN, Y., LANDAU, U., CUADROS-INOSTROZA, Á., TAKAYUKI, T., FERNIE, A. R., CHET, I., VITERBO, A. & WILLMITZER, L. 2013. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathog*, 9, e1003221.
- CAI, F., YU, G., WANG, P., WEI, Z., FU, L., SHEN, Q. & CHEN, W. 2013. Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology et Biochemistry*, 73, 106-113.
- CALLOW, N. V., RAY, C. S., KELBLY, M. A. & JU, L. K. 2016. Nutrient control for stationary phase cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb Technol*, 82, 8-14.
- CARDONA-AYALA, C., JARMA-OROZCO, A. & ARAMÉNDIZ-TATIS, H. 2013. Mecanismos de adaptación a sequía en caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7, 277-288.
- CARRILLO, L. 2003. *Microbiología Agrícola*, Universidad Nacional de Salta.
- CAYRE, M., VIGNOLO, G. & GARRO, O. 2001. Validación y comparación de modelos de crecimiento microbiano. *Universidad Nacional Del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Argentina*.
- CEPERO, Y., BELDARRAÍNTATIANA, NÚÑEZ MARGARITA, BRUSELAS ASTER & NORMA, V. 2013. Modelación matemática del crecimiento de *Lactibacillus casei* *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 23, 30-34.
- COELHO, C. M. M., MOTA, M., SOUZA, C. D. & MIQUELLUTI, D. 2010. Potencial fisiológico em sementes de cultivares de feijão crioulo (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, 32, 097-105.
- COOK, B., PENGELLY BC, BROWN SD, DONNELLY JL, EAGLES DA, FRANCO MA, HANSON J, M. B., PARTRIDGE IJ, PETERS M & S. K. 2005. Tropical Forages: An Interactive Selection Tool. *CD-ROM, CSIRO, DP & F (Qld), CIAT, ILRI*. Brisbane, Australia.

- CRUZAT, G. R. & IONANNIDIS, N. D. 2008. Biocontrol de Enfermedades Fungosas con *Trichoderma*. 28.
- CHAVERRI, P., BRANCO-ROCHA, F., JAKLITSCH, W., GAZIS, R., DEGENKOLB, T. & SAMUELS, G. J. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107, 558-590.
- CHEN, H. 2013a. Biotechnology Principles of Solid State Fermentation. *Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice*. Springer.
- CHEN, H. 2013b. *Modern solid state fermentation: theory and practice*, Springer Science & Business Media.
- CHEN, L., YANG, X., RAZA, W., LUO, J., ZHANG, F. & SHEN, Q. 2011. Solid-state fermentation of agro-industrial wastes to produce bioorganic fertilizer for the biocontrol of Fusarium wilt of cucumber in continuously cropped soil. *Bioresour Technol*, 102, 3900-10.
- DA COSTA, J. G. C., RAVA, C. A., ZIMMERMANN, F. J. P. & MELO, L. C. 2008. Yield stability and adaptability of common bean lines developed by Embrapa. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 38, 141.
- DE GOUVEIA, M., BOLÍVAR, Á., LÓPEZ, M., SALIH, A. & PÉREZ, H. 2011. Participación de agricultores en la selección de materiales genéticos de frijol (*Vigna unguiculata*) evaluados en suelos ácidos de la Parroquia Espino estado Guárico (Venezuela). *Cuadernos de Desarrollo Rural*, 2.
- DÍA, S. A. B. 2009. *Reciclado del orujo de uva como medio solido de fermentación para la producción de enzimas y hidrolíticas de interés industrial*. PhD Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz.
- DIOUF, D. & HILU, K. W. 2005. Microsatellites and RAPD markers to study genetic relationships among cowpea breeding lines and local varieties in Senegal. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 1057-1067.
- DJONOVIC, S. 2007. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol.*, 145, 875-889.
- DURAND, A. 2003. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 113-125.
- DUSTET MENDOZA, J. C., PEÑA, J. J., PÉREZ, W. & DÍAZ, M. 2002. Evaluación de un nuevo prototipo de biorreactor para fermentaciones en estado sólido de residuos fibrosos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36, 379-383.
- DYBZINSKI, R. & TILMAN, D. 2009. Competition and coexistence in plant communities. *The Princeton guide to ecology*, 186-195.
- EL-HASAN, A., WALKER, F., SCHÖNE, J. & BUCHENAUER, H. 2009. Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. *Eur J Plant Pathol*, 124, 457-470.
- ELÓSEGUI CLARO, O. 2006. *Metodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas.*, Ciudad de La Habana, Cuba, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
- ELÓSEGUI CLARO, O., FERNÁNDEZ-LARREA VEGA, O., PONCE GRIJUELA, E., BORGES MARÍN, G., ROVESTI, L. & JIMÉNEZ RAMOS, J. 2009. Colecta de esporas de *Trichoderma harzianum* Rifai cepa A34 por lecho fluidizado y ciclón dual. *Fitosanidad*, 13, 265-269.
- FANDIÑO, Y. 2009. *Estudio y regionalización de la variedad de frijol común INIVIT Punti Blanco (Phaseolus vulgaris L.), en la Zona Centro Oriental de Cuba*. Master en Ciencias Agrícolas, Universidad
- FERNÁNDEZ-LARREA, V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* 62, 96 - 100

- FERNÁNDEZ-LARREA, V. O. 2007. Pasado, presente y futuro del control biológico en Cuba. *Fitosanidad*, 11, 61-66.
- FERNANDEZ-FERNANDEZ, M., PEREZ-CORREA, R. & AGOSIN, E. 2005. Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. *ChemInform*, 36.
- FORZZA, R. C. 2010. Lista de espécies Flora do Brasil <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010>. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- GALINDO, E., FLORES, C., LARRALDE-CORONA, P., CORKIDI-BLANCO, G., ROCHA-VALADEZ, J. A. & SERRANO-CARREÓN, L. 2004. Production of 6-pentyl-a-pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 18, 1-8.
- GARCÉS FIALLOS, F. R., ZABALA PALACIOS, R. G., DIAZ CORONEL, T. G. & VERA AVILÈS, D. F. 2012. Agronomic and phytosanitary assessment of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm in the Ecuadorian humid tropic. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12, 230-240.
- GERVAIS, P. & MOLIN, P. 2003. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 85-101.
- GÓMEZ 2013. Evaluation of salinity tolerance in cowpea bean using variables related with nodulation and foliar nitrogen accumulation. *Cultivos Tropicales*, vol. 34, no. 3, , p. 11-16.
- GÓMEZ PADILLA, E. J., ARGENTEL MARTÍNEZ, L., AMADOR, C., ALARCÓN BARRERO, K., LÓPEZ SÁNCHEZ, R., RUIZ-DÍEZ, B., FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. & EICHLER-LOEBERMANN, B. 2013. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en frijol Caupí a partir de variables relacionadas con la nodulación y la acumulación de nitrógeno foliar. *Cultivos Tropicales*, 34, 11-16.
- GONZÁLEZ, M., CASTELLANOS, L., RAMOS, M. & PÉREZ, G. 2005. Efectividad de *Trichoderma* spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del frijol. *Fitosanidad*, 9, 37-41.
- GONZÁLEZ, N., ZAMORA, J., PÉREZ, C., SALAZAR, E., PÉREZ, E. & HERNÁNDEZ, A. 2016. Modelación de la influencia del pH y la temperatura en la velocidad de crecimiento de *Tsukamurella paurometabola* C-924. *Tecnología Química*, 29, 59-62.
- GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem*, 177, 751-766.
- GUILLÉN, T. A. 2016. EFECTO DE LA COMPETENCIA INTRAESPECÍFICA EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DEL YORIMÓN/THE EFFECT OF INTRASPECIFIC COMPETITION ON GROWTH AND PRODUCTIVE CHARACTERISTICS OF COWPEA (*Vigna unguiculata* L. Walp)/EFEITO DA COMPETÊNCIA INTRAESPECÍFICA NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DO FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Interciencia*, 41, 353-356.
- GUPTA, V. G., SCHMOLL, M., HERRERA-ESTRELLA, A., UPADHYAY, R., DRUZHININA, I. & TUOHY, M. (eds.) 2014. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*: Elsevier.
- HANADA, R. E. 2008. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycol. Res.*, 112, 1335-1343.
- HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I. & LORITO, M. 2004a. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*, 2, 43-56.
- HARMAN, G. E., PETZOLDT, R., COMIS, A. & CHEN, J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94, 147-153.
- HERMOSA, R., VITERBO, A., CHET, I. & MONTE, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158, 17-25.
- HERNÁNDEZ, C. 2012a. Paradigmas de la modelación en ingeniería. Universidad Autónoma de Sinaloa.

- HERNÁNDEZ, E. A. V. 2012b. Evaluation of the vegetative development of 19 lines of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cultivated at Santa Bárbara, Monagas state, Venezuela, in post rainy season, 2008. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12 (3), 522-529.
- HÖLKER, U. & LENZ, J. 2005. Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8, 301-306.
- HOWELL, C. R. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*, 96, 178-180.
- HOWELL, C. R., HANSON, L. E., STIPANOVIC, R. D. & PUCKHABER, L. S. 2000. Induction of Terpenoid Synthesis in Cotton Roots and Control of *Rhizoctonia solani* by Seed Treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90, 248-52.
- HOYOS-CARVAJAL, L., CARDONA, A., OSORIO, W. & ORDUZ, S. 2015. The effect of various isolates of *Trichoderma* spp. on nutrient uptake in beans (*Phaseolus vulgaris*) in two soil types. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9, 268-278.
- JAKLITSCH, W. M. & VOGLMAYR, H. 2013. New combinations in *Trichoderma* (Hypocreaceae, Hypocreales). *Mycotaxon*, 126, 143-156.
- JERNEJC, K., CIMERMA, A. & PERDIH, A. 1986. Comparison of different methods for protein determination in *Aspergillus niger* mycelium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 23, 445-448.
- KALOGERIS, E., INIOTAKI, F., TOPAKAS, E., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D. & MACRIS, B. J. 2003. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresource Technology*, 86, 207-213.
- KAMALA, T. & INDIRA, S. 2011. Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. *3 Biotech*, 1, 217-225.
- KUBICEK, C. P. & HARMAN, G. E. (eds.) 1998. *Trichoderma and Gliocladium. v1: Basic biology, taxonomy and genetics*: Taylor & Francis Ltd.
- KUBICEK, C. P., KOMON-ZELAZOWSKA, M. & DRUZHININA, I. S. 2008. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 9, 753-763.
- KUHLS, K., LIECKFELDT, E., SAMUELS, M., MEYER, G. J., KUBICEK, C. P. & BÖRNER, T. 1997. Revision of *Trichoderma* section *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on an analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* 89, 442-460.
- KUMAR, D., JAIN, V., SHANKER, G. & SRIVASTAVA, A. 2003. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochemistry*, 38, 1731-1738.
- LAGUNES-ESPINOZA, L. D. C., GALLARDO-LÓPEZ, F., BECERRIL-HERNÁNDEZ, H. & BOLAÑOS-AGUILAR, E. 2008. Diversidad cultivada y sistema de manejo de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata* en la región de la Chontalpa, Tabasco. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14, 13-21.
- LEE, C. K., DARAH, I. & IBRAHIM, C. O. 2011. Production and Optimization of Cellulase Enzyme Using *Aspergillus niger* USM AI 1 and Comparison with *Trichoderma reesei* via Solid State Fermentation System. *Biotechnology Research International*, 2011, 6.
- LEWIS, B., SCHRIRE B, MACKINDER B & LOCK M 2005. Legumes of the world. *Bol. Soc. Bot. Méx.*, 77, 75-77.
- LI, X., GAN Y., YANG X., ZHOU J., J., D. & M., X. 2008. Human health risk of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in edible fish from Huairou Reservoir and Gaobeidian Lake in Beijing, China. *Food Chemistry*, 109, 348-354.
- LONSANE, B., GHILDYAL, N., BUDIATMAN, S. & RAMAKRISHNA, S. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7, 258-265.

- LÓPEZ-ISUNZA F, LARRALDE-CORONA CP & G, V.-G. 1997. Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi. . *Chem Eng Sci*, 52, 2629-2639.
- LÓPEZ, E., F. J. UGALDE, CONTRERAS, R. & BARRADAS., A. 2001. Producción artesanal de semilla de frijol en Veracruz, México. *Agronomía Mesoamericana*, 12, 9-14.
- LÓPEZ, G. C. & BRESSANI, R. 2008. Use of cowpea (*Vigna unguiculata*) in mixtures with common beans (*Phaseolus vulgaris*) for the development of new food products. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 58, 71-80.
- LÓPEZ SALINAS, E., TOSQUY VALLE, Ó. H., VILLAR SÁNCHEZ, B., CUMPIÁN GUTIÉRREZ, J., UGALDE ACOSTA, F. J. & BECERRA LEOR, E. N. 2007a. Negro Papaloapan, nuevo cultivar de frijol para las áreas tropicales de México. *Agricultura técnica en México*, 33, 259-269.
- LÓPEZ SALINAS, E., TOSQUY VALLE, O. H., VILLAR SÁNCHEZ, B., UGALDE ACOSTA, F. J., CUMPIÁN GUTIÉRREZ, J. & BECERRA LEOR, E. N. 2007b. Negro papaloapan, nuevo cultivar de frijol para las áreas tropicales de Veracruz y Chiapas, México. *Agricultura técnica en México*, 33, 197-200.
- LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H. & PRETORIUS, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 66, p. 506-577.
- MA, L., LI, C., YANG, Z., JIA, W., ZHANG, D. & CHEN, S. 2013. Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. *Journal of biotechnology*, 166, 192-197.
- MALMIERCA, M. G., CARDOZA, R. E., ALEXANDER, N. J., MCCORMICK, S. P., COLLADO, I. G., HERMOSA, R., MONTE, E. & GUTIÉRREZ, S. 2013. Relevance of trichothecenes in fungal physiology: disruption of tri5 in *Trichoderma arundinaceum*. *Fungal Genetics and Biology*, 53, 22-33.
- MÁRQUEZ GUTIÉRREZ , M. E., FERNÁNDEZ-LARREA VEGA , O., JIMÉNEZ RAMOS , J., ELÓSEGUI CLARO , O., GÓMEZ GONZÁLEZ , R., CARRERAS SOLÍS , B., LAGUARDIA URRUTIA , E., MONZÓN CHÁVEZ , S., AYALA SIFONTES , J. L., MASSÓ VILLALÓN , E., VEITÍA RUBIO , M., BORGES MARÍN , G. & BARÓ ROBAINA , Y. (eds.) 2010. *Formas de obtención de controladores biológicos microbianos para su uso en el sistema de producción agrícola del MINAG*, La Habana: Cidisav.
- MARTÍNEZ, B., INFANTE, D. & REYES, Y. 2013. *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28, 1-11.
- MÁS-DIEGO, S. M. 2006. *Estudio del crecimiento de Trichoderma viride con empleo del campo magnético*. MSc., Universidad de Oriente.
- MÁS-DIEGO, S. M., MARTÍNEZ-MANRIQUE, C. E., SIMÓN-RICARDO, F. & FURIGO, A. F. J. 2013. Consideraciones sobre la introducción de la tecnología del campo magnético a la producción de bioplaguicidas en cuba. *Investigación y Saberes*, II, 8-26.
- MÁS-DIEGO, S. M., RODRÍGUEZ-RICO, I. L., MARTÍNEZ-MANRIQUE, C. E., MICHELENA-ÁLVAREZ, G. & FURIGO, A. F. J. 2015. Fermentación en estado sólido de *Trichoderma harzianum* bajo campos magnéticos. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 49, 40-45.
- MASTOURI, F., BJÖRKMAN, T. & HARMAN, G. E. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100, 1213-1221.
- MAZUTTI, M., CENI, G., DI LUCCIO, M. & TREICHEL, H. 2007. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30, 297-304.

- MEDINA, F., CHANG, W., BRACHO, J., MARÍN, M. & ESPARZA, D. 1996a. Efecto de la edad y el genotipo sobre el crecimiento del área foliar en el frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 13.
- MEDINA, F., CHANG, W., BRACHO, J., MARÍN, M. & ESPARZA, D. 1996b. Variación de peso seco en cinco genotipos de frijol, *Vigna unguiculata* (L.) Walp bajo condiciones de campo. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 13.
- MILLER, G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- MINISTERIO DE FINANZAS Y PRECIOS 2015. Resolución No. 236. Precios minoristas de los insumos agropecuarios, equipos e implementos agrícolas que se venden por las empresas comercializadoras del sistema de la Agricultura no cañera. La Habana. Cuba: Gaceta Oficial de la República de Cuba.
- MITCHELL, D., VON MEIEN OF & N, K. 2003. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochem Eng J*, 13, 137-147.
- MITCHELL, D. A., MEIEN, O. F. V., KRIEGER, N. & DALSENTER, F. D. H. 2004. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 17, 15-26.
- MORAN-DIEZ, E. 2009. The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*–plant beneficial interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 22, 1021-1031.
- MORÁN-DIEZ, M. E., TRUSHINA, N., LAMDAN, N. L., ROSENFELDER, L., MUKHERJEE, P. K., KENERLEY, C. M. & HORWITZ, B. A. 2015. Host-specific transcriptomic pattern of *Trichoderma virens* during interaction with maize or tomato roots. *BMC Genomics*, 16, 8.
- MURILLO-AMADOR, B., TROYO-DIEGUEZ, E. & PARGAS-LARA, R. 1997. Rendimiento y calidad de doce genótipos de chícharo de vaca\ *Vigna unguiculata* (L.) Walp] en baja california sur, MÉXICO. YIELD AND QUALITY OF TWELVE GENOTYPES OF COWPEA\ *Vigna unguiculata* (L.) Walp] IN BAJA CALIFORNIA SUR, MÉXICO. *Rev.Fitotec.Mex*, 20 149-160.
- MUSSATTO, S. I., BALLESTEROS, L. F., MARTINS, S. & TEIXEIRA, J. A. 2012. Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In: SHOW, K.-Y. (ed.) *Industrial waste*. InTech.
- NALDI, G., PARESCHI, L. & TOSCANI, G. 2010. *Mathematical modeling of collective behavior in socio-economic and life sciences*, Springer Science & Business Media.
- OPORTA, P., EVELING DEL SOCORRO & RIVAS, C., ARELIS MARÍA. 2006. *Efecto de la densidad poblacional y la época de siembra en el rendimiento y la calidad de la semilla de una población de caupí rojo (Vigna unguiculata (L.) Walp) en la Finca El Plantel*. Universidad Nacional Agraria, UNA.
- PADULOSI, S. & NG, N. 1997. Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. SINGH, BB et al. *Advances in cowpea research*, 1, 1-12.
- PALACIOS, L., ANIELKA & MONTENEGRO, C., DALIA. 2006. *Efecto de cinco distancias y tres épocas de siembra sobre el crecimiento y rendimiento del caupí rojo (Vigna unguiculata (L.) Walpers)*, Ciudad Darío, Matagalpa. Universidad Nacional Agraria, UNA.
- PANDEY, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13, 81.
- PANDEY, A., SOCCOL, C. R. & LARROCHE, C. (eds.) 2008. *Current Developments in Solid-state Fermentation*, New York, NY: Springer New York.
- PANDEY, A., SOCCOL, C. R., RODRIGUEZ-LEON, J. A. & NIGAM, P. 2001. Solid-State Fermentation in Biotechnology: fundamentals and applications. *New Delhi: Asiatech*, 221p.
- PEÑA, K. 2015. Efecto de un promotor del crecimiento activado molecularmente sobre la germinación y la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Infociencia*, 19, 1-12.

- PHANSAK, P., TAYLOR, P. W. J. & MONGKOLPORN, O. 2005. Genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) and related *Vigna* species using sequence tagged microsatellite site analysis. *Scientia Horticulturae*, 106, 137-146.
- PONCE, M., ORTIZ, R., RÍOS, H., DE LA FÉ, C., VERDE, G., MARTÍNEZ, M., CARBONELL, A., MARTÍN, A., ACOSTA, R. & MIRANDA, S. 2003. Caracterización de una amplia colección de frijoles y resultados de la selección campesina. *Cultivos Tropicales*, 24, 85-88.
- QI, W. & ZHAO, L. 2013. Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *Journal of basic microbiology*, 53, 355-364.
- RAGHAVARAO, K., RANGANATHAN, T. & KARANTH, N. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 127-135.
- RAHAEIFARD, M., OTHMAN, N. Z., THEN, C., H'NG, W. C., ABD, R. & EL ENSHASY, H. A. 2013. Statistical Medium Optimization for High Biomass Production of *Trichoderma Harzianum*: A Potential Biocontrol Agent for Ganoderma Oil Palm Disease.
- RAIMBAULT, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 1, 174-188.
- ROCHA-RAMIREZ, V. 2002. *Trichoderma atroviride* G.-protein α -subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot. Cell*, 1, 594-605.
- ROCHA-VALADEZ, J. A., ESTRADA, M., GALINDO, E. & SERRANO-CARREÓN, L. 2006. From shake flasks to stirred fermentors: Scale-up of an extractive fermentation process for 6-pentyl-apyrone production by *Trichoderma harzianum* using volumetric power input. *Process Biochemistry*, 41, 1347-1352.
- ROCHA, V. A. L., MAEDA, R. N., SANTA ANNA, L. M. M. & PEREIRA, N. 2013. Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by *Trichoderma harzianum* in optimized culture medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16, 1-11.
- ROCHA, V. A. L., R, N. M., PEREIRA, N., JR., M, F. K., ELIAS, L., SIMISTER, R., STEELE-KING, C., GOMEZ, L. D. & MCQUEEN-MASON, S. J. 2016. Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin. *Biotechnol Prog*, 32, 327-36.
- RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A., DOMENECH, F., LEÓN, M., MÉNDEZ, T., RODRÍGUEZ, D. E. & PANDEY, A. 1999. Production of spores of *Trichoderma harzianum* on sugar cane molasses and bagasse pith in solid state fermentation for biocontrol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42, 0.
- RODRÍGUEZ, M. G., GONZÁLEZ, L. C., FERNÁNDEZ, M. R., PÉREZ, G., CARRETERA, E. D. C. L. C. & DE CUMANAYAGUA, C. 2008. Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. contra patógenos en semillas de frijol, lechuga, girasol y arroz. *Centro Agrícola*, 35, 11-15.
- RUBIO, M. B., DOMÍNGUEZ, S., MONTE, E. & HERMOSA, R. 2012. Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays. *Microbiology*, 158, 119-128.
- SAMOLSKI, I., RINCÓN, A. M., PINZÓN, L. M., VITERBO, A. & MONTE, E. 2012. The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology*, 158, 129-138.
- SARMIENTO-FRANCO, L. A., GOROCICA, E., RAMIREZ, L., CASTILLO, J., SANTOS, R. & DIAZ, M. 2010. True metabolizable energy and digestibility of five *Vigna unguiculata* varieties in chickens. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 179-183.
- SCHUSTER, A. & SCHMOLL, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87, 787-799.
- SEGARRA, G. 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*, 7, 3943-3952.

- SHINDOI, M., PRAUSE, J. & JOVER, P. 2012. Descomposición de *Vigna unguiculata* (caupí) en un Argiudol típico de Colonia Benítez, Chaco. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 38, 86-90.
- SHORESH, M., HARMAN, G. E. & MASTOURI, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, 48, 21-43.
- SINGH, B. 2005. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement*, 1, 117-162.
- SINGH, B., AJEIGBE HA, TARAWALI SA, FERNANDEZ RS & M, A. 2003. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. . *Field Crops Res.*, 84, 169-177.
- SIVILA, N. & ALVAREZ, S. 2013. Producción Artesanal de *Trichoderma*. Argentina: CEDAF.
- SOCCOL, C. R., DA COSTA, E. S. F., LETTI, L. A. J., KARP, S. G., WOICIECHOWSKI, A. L. & DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P. 2017. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*.
- SOSA, D., BOUCOURT, R. & DUSTET, J. C. 2012. Uso de la modelación matemática en los procesos de fermentación en estado sólido de sustratos fibrosos destinados a la alimentación animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46, 119-126.
- STEFANOVA, M., DE VILLEGAS, M. E. D. & MENA, J. 1999a. Control biológico de enfermedades de plantas en Cuba. *Control Biológico de Enfermedades de Plantas en América Latina y el Caribe*, 201.
- STEFANOVA, M., LEIVA, A. & LARRINAGA, L. 1999b. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 16, 509-516.
- SUBASH, N., VIJI, J., SASIKUMAR, C. & MEENAKSHISUNDARAM, M. 2013. Isolation, media optimization and formulation of *Trichoderma harzianum* in agricultural soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 3, 61-64.
- SUBRAMANIAM, R. & VIMALA, R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Science and Nature*, 3, 480-486.
- SUN, F. A. C., H. 2008. Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: Investigation of possible sources. *Chemosphere*, 71, 1866-1869.
- THOMAS, L., LARROCHE, C. & PANDEY, A. 2013. Current developments in solid-state fermentation (Review). *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146-161.
- TOMOOKA, N., ISEMURA, T., NAITO, K., KAGA, A. & VAUGHAN, D. 2014. *Vigna* species. *Broadening the Genetic Base of Grain Legumes*. Springer.
- USDA. 2016. *National Nutrient Database for Standard Reference* [Online]. United States Department of Agriculture. Available: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list?qlookup=16063&format=Full>.
- VARGAS, Y. R., VILLAMIL, O. E., MURILLO, E., MURILLO, W. & SOLANILLA, J. F. 2012. Caracterización fisicoquímica y nutricional de la harina de frijol caupí *Vigna unguiculata* L. cultivado en Colombia. *Vitae*, 19, S320-S321.
- VENDRAMINI, J., ARTHINGTON, J. & ADESOGAN, A. 2012. Effects of incorporating cowpea in a subtropical grass pasture on forage production and quality and the performance of cows and calves. *Grass and Forage Science*, 67, 129-135.
- VINALE, F., GHISALBERTI, E. L., SIVASITHAMPARAM, K., MARRA, R., RITIENI, A., FERRACANE, R., WOO, S. & LORITO, M. 2009. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Lett Appl Microbiol*, 48, 705-11.

- VINALE, F., MANGANIELLO, G., NIGRO, M., MAZZEI, P., PICCOLO, A., PASCALE, A., RUOCCO, M., MARRA, R., LOMBARDI, N., LANZUISE, S., VARLESE, R., CAVALLO, P., LORITO, M. & WOO, S. L. 2014a. A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. *Molecules*, 19, 9760-72.
- VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. L., MARRA, R., WOO, S. L. & LORITO, M. 2008. *Trichoderma* – plant – pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 1-10.
- VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. L., WOO, S. L., NIGRO, M., MARRA, R., LOMBARDI, N., PASCALE, A., RUOCCO, M., LANZUISE, S., MANGANIELLO, G. & LORITO, M. 2014b. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8, 127-139.
- VITERBO, A., LANDAU, U., KIM, S., CHERNIN, L. & CHET, I. 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol. Lett.*, 305, 42-48.
- WOO, S. L., RUOCCO, M., VINALE, F., NIGRO, M., MARRA, R., LOMBARDI, N., PASCALE, A., LANZUISE, S. & MANGANIELLO, G. 2014. *Trichoderma* -based Products and their Widespread Use in Agriculture. *Open Mycology Journal*, 71-126.
- YEDIDIA, I. I., BENHAMOU, N. & CHET, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1061-1070.
- YOON, L. W., ANG, T. N., NGOH, G. C. & CHUA, A. S. M. 2014. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, 67, 319-338.
- ZHANG, J. D. & YANG, Q. 2015. Optimization of solid-state fermentation conditions for *Trichoderma harzianum* using an orthogonal test. *Genet Mol Res*, 14, 1771-81.
- ZHU, J.-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6, 66-71.
- ZWIETERING, M., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F. & VAN'T RIET, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56, 1875-1881.

Anexos

Anexo 1. Determinación de proteínas totales por el método de Biuret

Las proteínas y péptidos reaccionan con iones de cobre en solución alcalina, formando un quelato color violeta de configuración desconocida. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de proteínas presente en la muestra. La lectura se hace a una longitud de onda de 530 nm. Esta técnica es útil para la detección de proteínas en el intervalo de no menores a 0,05 mg/mL (preferentemente 0,5-20 mg/mL)

Materiales

Tubos de ensayo (2 por muestra) incluyendo blanco y controles positivos.

Micro pipetas ajustables y puntas.

Gradillas para tubos de ensayo

Reactivos:

Reactivo de Biuret: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , NaOH 5 mol/L

(El reactivo de Biuret también se comercializa preparado)

Albúmina de suero (BSA) (patrón)

Equipamiento:

Espectrofotómetro, balanza analítica, homogenizador (para preparar el homogenado de tejidos).

Preparación de la solución reactiva de Biuret

Disolver 1,9 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 3,35 g de Na_2EDTA en 350 mL de agua destilada. Agregar lentamente y con agitación constante 100 mL de solución fresca de NaOH 5 mol/L. Aforar a 500 mL con agua destilada.

Curva de calibración:

Se utiliza BSA como patrón; se renueva la curva cada dos semanas, se procesa con las muestras al menos 2 muestras de BSA de concentración conocida.

Procedimiento

A 50 μ L de la muestra se le añade 3 mL de solución reactivo de Biuret (para el blanco 50 μ L de agua destilada) se agita y se deja en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se lee la absorbancia contra blanco a 530 nm.

Deben prepararse las cantidades del reactivo adecuadas en dependencia del volumen de muestras a procesar, en las dos semanas posteriores a su preparación la curva patrón deberá renovarse.

Se realiza una curva patrón plotando las concentraciones de BSA (al menos 5) contra la media de la D.O. para cada concentración, calcule la ecuación de la recta.

Se comprueba que las muestras de concentración conocida de BSA que ha procesado junto a las muestras en ensayo no se han desviado más de un 5% del valor esperado.

Se promedian los valores de D.O. de las muestras y calcule la concentración de proteínas utilizando la ecuación de la recta.

Anexo 2. Determinación de la concentración de azúcares reductores por el método de Miller (1959)

Preparación del reactivo 3,5 dinitrosalisílico (DNS) (para 1 litro).

A. Solución de NaOH 2N: pesar 16 g de NaOH, disolver en H₂O destilada y enrasar a 200 mL.

B. Solución de tartrato de sodio-potasio: pesar 300 g, disolver en agua destilada caliente y enrasar a 500 mL.

C. Preparación del reactivo DNS:

-Pesar 10 g de ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS) y disolver en la solución de NaOH 2N caliente (100 °C).

-Una vez disuelto el DNS, se añade a un volumétrico de 1L que debe contener aproximadamente 100 mL de la solución de tartrato-potasio caliente.

-Con la solución de tartrato restante arrastrar el DNS que queda disuelto en el vaso de precipitado.

-Enfriar, completar a un litro con agua destilada y filtrar.

2) Preparación de buffer Citrato 0,1 M, pH = 4,8.

A: 0,1 M solución de Citrato disódico (21 g de ácido cítrico disuelto en 200 mL de NaOH 1N en 1 litro)

B: HCl 0,1N

X = 88,2 mL X mL de A + Y mL de B en 100 mL (para pH = 4,8)

Y = 100 – 88,2

Blanco reactivo (control)

A 1,5 mL de agua destilada se añaden 3 mL de DNS y se colocan a hervir en un baño a 100 °C durante 5 min. Adicionar 16 mL de agua, agitar y usar para calibrar el espectrofotómetro.

Anexo 3. Caracterización del suelo

Anexo 3.1 Caracterización del suelo antes de la siembra

Análisis químico de las muestras

No muestras	No Labt	% Ca	% Mg	% Na	% K	% P
5 cm	9853	2,12	1,52	1,07	0,48	0,111
10 cm	9854	2,11	1,42	1,07	0,56	0,111
20 cm	9855	2,15	1,32	1,18	0,47	0,095
30 cm	9856	1,88	1,23	1,02	0,35	0,076

Análisis físico de las muestras

No muestras	No Labt	Arena Gr ≥ 0,25	Arena Fin 0,2 -0,02	Limo Gru 0,02	Lim fin 0,01-0,005
5 cm	1025	5,0	2,1	66,7	12,9
10 cm	1026	5,2	0,6	70,9	7,9

20 cm	1027	6,6	0,3	67,6	12,7
30 cm	1028	12,7	0,2	63,4	11,8

Límite líquido

5 cm	No. golpes	Peso H (g)	Peso seco(g)	Humedad %	Humedad de golpe 25
	28	20,92	12,95	40,5	38,5
	24	20,5	12,58	40,7	
	20	22,1	13,42	41	
10 cm	No. golpes	Peso H (g)	Peso seco(g)	Humedad %	Humedad de golpe 25
	28	22,86	13,61	40,5	40,7
	24	22,32	13,24	40,7	
	20	21,06	12,43	41,0	
20 cm	No. golpes	Peso H (g)	Peso seco(g)	Humedad %	Humedad de golpe 25
	27	23,57	13,90	41,0	41,3
	23	21,89	12,81	41,5	
	19	22,24	12,98	41,6	
30 cm	No. golpes	Peso H (g)	Peso seco(g)	Humedad %	Humedad de golpe 25
	29	20,72	12,13	41,5	42,3
	26	21,45	12,40	42,2	
	21	21,64	12,46	42,4	

Determinación de pH y conductividad

pH en KCl	pH en H ₂ O	Conduct(μ/cm)	ICT (meq/100)	% Mat Org
6,54	7,94	394	46,82	2,05
6,52	7,88	380	41,50	2,07
6,47	7,93	408	48,09	2,10
6,20	7,63	421	39,80	1,84

Composición de arcilla

Arcilla 0,002-0,001	Tipo de textura
13,3	Franca
14,6	Franca
12,8	Franca
11,9	Franca

Límite plástico

	% IP
5 cm	13,2
10 cm	15,4
20 cm	11,4
30 cm	12,7

Determinación de humedad

Peso H (g) 5 cm	Peso seco(g)	Humedad (%)	Peso H (g) 10 cm	Peso seco(g)	Humedad (%)
11,60	8,67	25,3	9,87	7,37	25,3
13,13	9,81	25,3	9,27	6,94	25,2
Peso H (g) 20 cm	Peso seco(g)	Humedad (%)	Peso H (g) 30 cm	Peso seco(g)	Humedad (%)
11,22	7,85	30,1	9,58	6,78	29,2
12,83	9,02	29,7	9,09	6,36	30,0

Anexo 3.2 Caracterización del suelo después de la siembra

Análisis químico de las muestras

No muestras	No. Labt.	% Ca	% Mg	% Na	% K	% P	%MO
5 cm (T)	10378	2,51	2,24	1,44	0,70	0,244	2,5
5 cm	10379	3,21	2,20	1,37	0,66	0,264	2,1
10 cm	10380	3,00	2,20	1,44	0,63	0,255	1,5
20 cm	10381	3,25	2,65	1,30	0,65	0,215	1,2

Análisis físico de las muestras

No muestras	No Labt	Arena Gr $\geq$ 0,25	Arena Fin 0,2 -0,02	Limo Gru 0,02	Lim fin 0,01-0,005
5 cm (T)	1116	7,1	8,6	69,5	4,2
5 cm	1117	10,3	7,9	70,6	2,6
10 cm	1118	5,8	7,3	72,8	3,9
20 cm	1119	8,6	3,4	66,1	12,0

Límite líquido

5 cm (T)	No. golpes	Peso H (g)	Peso seco(g)	Humedad %	Humedad de golpe 25
	28	22,23	12,92	41,9	41,5
	24	21,96	12,72	42,1	
	20	22,39	12,64	44	
5 cm	No. golpes	Peso H (g)	Peso seco(g)	Humedad %	Humedad de golpe 25
	28	23,70	14,07	40,6	41,2
	24	20,74	12,09	41,7	
	20	23,63	13,73	41,9	
10 cm	No. golpes	Peso H (g)	Peso seco(g)	Humedad %	Humedad de golpe 25
	27	21,59	12,26	43,2	43,1
	23	23,97	13,55	43,5	
	19	23,95	13,51	43,6	
20 cm	No. golpes	Peso H (g)	Peso seco(g)	Humedad %	Humedad de golpe 25
	29	19,86	11,09	44,2	44,6
	26	20,37	11,35	43,5	
	21	21,12	11,66	43,6	

Determinación de pH y conductividad

pH en KCl	pH en H ₂ O	Conduct (μ/cm)	ICT (meq/100)
6,65	7,64	560	41,51
6,64	7,82	535	39,8
6,50	7,70	577	41,61
6,40	7,52	605	43,34

Composición de arcilla

Arcilla 0,002-0,001	Tipo de textura
10,6	Franca
8,6	Franca
10,4	Franca
9,9	Franca

Límite plástico

	% IP
5 cm (T)	4,1
5 cm	30,7
10 cm	16,0
20 cm	16,9

Determinación de humedad

Peso H (g) 5 cm (T)	Peso seco(g)	Humedad (%)	Peso H (g) 5 cm	Peso seco(g)	Humedad (%)
14,21	9,26	34,8	10,67	9,05	15,2
15,35	9,21	40,0	10,23	9,64	5,7

Peso H (g) 10 cm	Peso seco(g)	Humedad (%)	Peso H (g) 20 cm	Peso seco(g)	Humedad (%)
12,95	9,43	27,2	11,03	7,99	27,6
13,75	9,98	27,4	9,59	6,63	27,7

Anexo 4. Modelación

Resultados para el modelo de Gompertz

Sgompertz		Valor	Error Estándar
Prototipo	a	3,61092	0,08576
Prototipo	xc	43,88578	1,75422
Prototipo	k	0,05193	0,00651
Modelo	a	2,86434	0,13742
Modelo	xc	47,47671	3,28015
Modelo	k	0,07768	0,02541

	Prototipo	Modelo
Número de puntos	16	16
Grados de libertad	13	13
Chi-cuadrado reducida	0,03536	0,12199
Suma de cuadrados residual	0,45964	1,58587
R ² del ajuste.	0,98518	0,93176

	DF	Estadística	Valor de p	Decisión al nivel (5%)
Residuos Prototipo	16	0,20216	0,47543	NO rechaza la normalidad
Residuos Modelo	16	0,20985	0,42705	NO rechaza la normalidad

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrados	Valor F	Prob>F
Prototipo	3	114,8437	38,28123	1082,71393	3,44E-15
Prototipo	13	0,45964	0,03536		
Prototipo	16	115,30334			
Prototipo	15	35,79569			
Modelo	3	75,32507	25,10836	205,82304	1,44E-10
Modelo	13	1,58587	0,12199		
Modelo	16	76,91094			
Modelo	15	26,81688			

Resultados para el modelo de Richards

Srichards2		Valor	Error Estándar
Prototipo	a	3,61893	0,1005
Prototipo	xc	42,76233	6,75541
Prototipo	d	0,88141	0,5452
Prototipo	k	0,04986	0,01426
Modelo	a	2,86221	0,15233
Modelo	xc	47,40759	12,35277
Modelo	d	0,97465	1,53338
Modelo	k	0,07752	0,05818

	Prototipo	Modelo
Número de puntos	16	16
Grados de libertad	12	12
Chi-cuadrado reducida	0,03668	0,13192
Suma de cuadrados residual	0,44017	1,58302
R ² del ajuste.	0,98463	0,92621

	DF	Estadística	Valor de p	Decisión al nivel (5%)
Residuos Prototipo	16	0,19903	0,49607	NO rechaza la normalidad
Residuos Modelo	16	0,20872	0,43394	NO rechaza la normalidad

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrados	Valor F	Prob>F
Prototipo	4	114,86317	28,71579	782,85896	5,05E-14
Prototipo	12	0,44017	0,03668		
Prototipo	16	115,30334			
Prototipo	15	35,79569			
Modelo	4	75,32791	18,83198	142,75443	1,19E-09
Modelo	12	1,58302	0,13192		
Modelo	16	76,91094			
Modelo	15	26,81688			

Resultados para el modelo Logístico

Slogistic1		Valor	Error Estándar
Prototipo	a	3,55811	0,09202
Prototipo	xc	52,34334	2,21422
Prototipo	k	0,07679	0,01103
Modelo	a	2,84976	0,13511
Modelo	xc	53,61543	3,54283
Modelo	k	0,10791	0,03562

	Prototipo	Modelo
Número de puntos	16	16
Grados de libertad	13	13
Chi-cuadrado reducida	0,05241	0,13156
Suma de cuadrados residual	0,68137	1,71032
R ² del ajuste.	0,97804	0,92641

	DF	Estadística	Valor de p	Decisión al nivel (5%)
Residuos Prototipo	16	0,26813	0,16628	NO rechaza la normalidad
Residuos Modelo	16	0,20441	0,46091	NO rechaza la normalidad

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrados	Valor F	Prob>F
Prototipo	3	114,62197	38,20732	728,96954	4,49E-14
Prototipo	13	0,68137	0,05241		
Prototipo	16	115,30334			
Prototipo	15	35,79569			
Modelo	3	75,20062	25,06687	190,5316	2,34E-10
Modelo	13	1,71032	0,13156		
Modelo	16	76,91094			
Modelo	15	26,81688			

Anexo 5 Procesamiento estadístico

Efecto	Test de significación Univariado Error estándar de la Estimación : 1,306081					
	Efecto (F/A)	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
Intercepto	Fijo	18788,45	1	18788,45	6263,427	0,000000
Var1	Fijo	262,43	2	131,22	50,645	0,000000
Var2	Aleatorio	56,99	19	3,00	0,905	0,581226
Var3	Fijo	9,30	2	4,65	1,915	0,161246
Var1*Var2	Aleatorio	98,46	38	2,59	1,519	0,061546
Var1*Var3	Fijo	15,47	4	3,87	2,267	0,069716
Var2*Var3	Aleatorio	92,26	38	2,43	1,423	0,096216
Error		129,64	76	1,71		

	Estadística Descriptiva						
Efecto	Nivel del factor	N	Emergencia (%) Media	Emergencia (%) Desv. Est.	Emergencia (%) Err Est.	Emergencia (%) -95,00%	Emergencia (%) 95,00%
Total		18	40,94444	15,84752	3,735296	33,06366	48,82523
Variedades	V-1	6	50,58333	7,73574	3,158102	42,46517	58,70149
Variedades	V-2	6	51,41667	5,73076	2,339575	45,40260	57,43074
Variedades	V-3	6	20,83333	5,72422	2,336902	14,82614	26,84053
Tratamiento	T-1	6	41,91667	14,63358	5,974134	26,55967	57,27367
Tratamiento	T-2	6	37,91667	16,31385	6,660101	20,79633	55,03700
Tratamiento	T-3	6	43,00000	18,87856	7,707140	23,18817	62,81183

	Estadística Descriptiva							
Efecto	Nivel del factor	Nivel del factor	N	Altura (cm) Media	Altura (cm) Desv. Est.	Altura (cm) Err Est.	Altura (cm) -95,00%	Altura (cm) 95,00%
Total			180	11,52278	1,572488	0,117206	11,29149	11,75406
Variedades	V-1		60	12,36500	1,236428	0,159622	12,04560	12,68440
Variedades	V-2		60	11,13667	1,575659	0,203417	10,72963	11,54370
Variedades	V-3		60	11,06667	1,551125	0,200249	10,66597	11,46736
Tratamiento	T-1		60	11,21333	1,737665	0,224332	10,76445	11,66222
Tratamiento	T-2		60	11,39500	1,439800	0,185877	11,02306	11,76694
Tratamiento	T-3		60	11,96000	1,449512	0,187131	11,58555	12,33445
Variedades*Tratamiento	V-1	T-1	20	12,13000	1,297812	0,290200	11,52261	12,73739
Variedades*Tratamiento	V-1	T-2	20	11,99500	1,290237	0,288506	11,39115	12,59885
Variedades*Tratamiento	V-1	T-3	20	12,97000	0,900351	0,201325	12,54862	13,39138
Variedades*Tratamiento	V-2	T-1	20	10,21000	1,573765	0,351905	9,47346	10,94654
Variedades*Tratamiento	V-2	T-2	20	11,31500	1,214073	0,271475	10,74680	11,88320
Variedades*Tratamiento	V-2	T-3	20	11,88500	1,493944	0,334056	11,18581	12,58419

Variedades*Tratamiento	V-3	T-1	20	11,30000	1,806421	0,403928	10,45457	12,14543
Variedades*Tratamiento	V-3	T-2	20	10,87500	1,621200	0,362511	10,11626	11,63374
Variedades*Tratamiento	V-3	T-3	20	11,02500	1,217363	0,272211	10,45526	11,59474

	Estadística Descriptiva							
Efecto	Nivel del factor	Nivel del factor	N	Diámetro (mm) Media	Diámetro (mm) Desv. Est.	Diámetro (mm) Err Est.	Diámetro (mm) -95,00%	Diámetro (mm) 95,00%
Total			180	4,577778	0,642582	0,047895	4,483266	4,672290
Variedades	V-1		60	4,783333	0,613179	0,079161	4,624932	4,941734
Variedades	V-2		60	4,350000	0,546948	0,070611	4,208708	4,491292
Variedades	V-3		60	4,600000	0,693798	0,089569	4,420773	4,779227
Tratamiento	T-1		60	4,600000	0,668923	0,086358	4,427199	4,772801
Tratamiento	T-2		60	4,450000	0,594466	0,076745	4,296433	4,603567
Tratamiento	T-3		60	4,683333	0,650728	0,084009	4,515233	4,851434
Variedades*Tratamiento	V-1	T-1	20	4,950000	0,686333	0,153469	4,628786	5,271214
Variedades*Tratamiento	V-1	T-2	20	4,550000	0,510418	0,114133	4,311117	4,788883
Variedades*Tratamiento	V-1	T-3	20	4,850000	0,587143	0,131289	4,575209	5,124791
Variedades*Tratamiento	V-2	T-1	20	4,200000	0,410391	0,091766	4,007931	4,392069
Variedades*Tratamiento	V-2	T-2	20	4,250000	0,444262	0,099340	4,042079	4,457921
Variedades*Tratamiento	V-2	T-3	20	4,600000	0,680557	0,152177	4,281489	4,918511
Variedades*Tratamiento	V-3	T-1	20	4,650000	0,670820	0,150000	4,336046	4,963954
Variedades*Tratamiento	V-3	T-2	20	4,550000	0,759155	0,169752	4,194705	4,905295
Variedades*Tratamiento	V-3	T-3	20	4,600000	0,680557	0,152177	4,281489	4,918511

	Estadística Descriptiva							
Efecto	Nivel del factor	Nivel del factor	N	No. Vainas Media	No. Vainas Desv. Est.	No. Vainas Err Est.	No. Vainas -95,00%	No. Vainas 95,00%
Total			90	13,25556	5,115654	0,539237	12,18410	14,32701
Variedades	V-1		30	9,20000	3,325969	0,607236	7,95806	10,44194
Variedades	V-2		30	13,96667	3,537809	0,645913	12,64563	15,28771
Variedades	V-3		30	16,60000	5,256195	0,959646	14,63730	18,56270
Tratamiento	T-1		30	13,13333	5,076880	0,926907	11,23760	15,02907
Tratamiento	T-2		30	13,63333	4,916428	0,897613	11,79751	15,46916
Tratamiento	T-3		30	13,00000	5,489802	1,002296	10,95007	15,04993
Variedades*Tratamiento	V-1	T-1	10	9,00000	3,559026	1,125463	6,45403	11,54597
Variedades*Tratamiento	V-1	T-2	10	9,00000	2,260777	0,714920	7,38274	10,61726
Variedades*Tratamiento	V-1	T-3	10	9,60000	4,195235	1,326650	6,59891	12,60109
Variedades*Tratamiento	V-2	T-1	10	13,70000	3,164034	1,000555	11,43659	15,96341
Variedades*Tratamiento	V-2	T-2	10	14,30000	3,093003	0,978093	12,08740	16,51260

Variedades*Tratamiento	V-2	T-3	10	13,90000	4,532598	1,433333	10,65757	17,14243
Variedades*Tratamiento	V-3	T-1	10	16,70000	5,186521	1,640122	12,98979	20,41021
Variedades*Tratamiento	V-3	T-2	10	17,60000	4,623611	1,462114	14,29247	20,90753
Variedades*Tratamiento	V-3	T-3	10	15,50000	6,186904	1,956471	11,07416	19,92584

	Estadística Descriptiva							
Efecto	Nivel del factor	Nivel del factor	N	Semillas por vaina Media	Semillas por vaina Desv. Est.	Semillas por vaina Err Est.	Semillas por vaina -95,00%	Semillas por vaina 95,00%
Total			90	11,85556	3,478864	0,366704	11,12692	12,58419
Variedades	V-1		30	10,40000	2,386745	0,435758	9,50877	11,29123
Variedades	V-2		30	12,50000	3,607941	0,658717	11,15277	13,84723
Variedades	V-3		30	12,66667	3,889272	0,710081	11,21439	14,11894
Tratamiento	T-1		30	10,66667	2,808034	0,512675	9,61813	11,71520
Tratamiento	T-2		30	12,16667	3,714680	0,678205	10,77958	13,55375
Tratamiento	T-3		30	12,73333	3,619233	0,660779	11,38189	14,08478
Variedades*Tratamiento	V-1	T-1	10	11,70000	2,057507	0,650641	10,22815	13,17185
Variedades*Tratamiento	V-1	T-2	10	9,60000	1,429841	0,452155	8,57715	10,62285
Variedades*Tratamiento	V-1	T-3	10	9,90000	3,034981	0,959745	7,72891	12,07109
Variedades*Tratamiento	V-2	T-1	10	10,10000	2,514403	0,795124	8,30130	11,89870
Variedades*Tratamiento	V-2	T-2	10	13,00000	4,268749	1,349897	9,94632	16,05368
Variedades*Tratamiento	V-2	T-3	10	14,40000	2,590581	0,819214	12,54681	16,25319
Variedades*Tratamiento	V-3	T-1	10	10,20000	3,614784	1,143095	7,61414	12,78586
Variedades*Tratamiento	V-3	T-2	10	13,90000	3,573047	1,129897	11,34400	16,45600
Variedades*Tratamiento	V-3	T-3	10	13,90000	3,573047	1,129897	11,34400	16,45600

	Estadística Descriptiva							
Efecto	Nivel del factor	Nivel del factor	N	Peso Media	Peso Desv. Est.	Peso Err Est.	Peso -95,00%	Peso 95,00%
Total			9	18,73718	3,077967	1,025989	16,37124	21,10311
Variedades	V-1		3	16,66533	1,80705	1,043301	12,17637	21,15429
Variedades	V-2		3	17,05467	1,65344	0,954614	12,94729	21,16204
Variedades	V-3		3	22,49153	0,261499	0,150976	21,84193	23,14113
Tratamiento	T-1		3	18,48623	3,478007	2,008029	9,84638	27,12608
Tratamiento	T-2		3	18,584	3,902321	2,253006	8,8901	28,2779
Tratamiento	T-3		3	19,1413	3,193158	1,84357	11,20906	27,07354