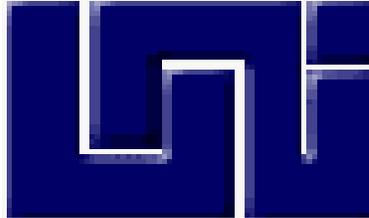


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

**FACULTAD DE INGENIERIA QUÍMICA**



**DESARROLLO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE *TRICHODERMAS*  
NATIVAS PREVIAMENTE IDENTIFICADAS DE DIFERENTES REGIONES DE  
NICARAGUA**

TRABAJO DE DIPLOMA PRESENTADO POR:

**Br. López Martínez Tatiana de los Ángeles  
Br. Rodríguez Toruño Ángeles Lucía**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

**INGENIERO QUÍMICO**

TUTOR:

**PhD. Leandro Alberto Páramo Aguilera**

Managua, Nicaragua

Noviembre 2021

## AGRADECIMIENTO

*A Dios, por permitirme culminar con éxito esta meta profesional en mi vida, por la sabiduría e inteligencia que me regala siempre para llevar a cabo mis planes, por el aliento de vida que me regala cada día y por los milagros que hace en mi vida que me impulsa a confiar siempre en Él.*

*A mi madre Martha Patricia Martínez, por ser un pilar principal en mi vida, por brindarme su apoyo incondicionalmente para llevar a cabo mis metas, por corregirme con amor y sabiduría, pero sobre todo por guiarme siempre por el camino correcto.*

*A Abner Lezama González, por su apoyo incondicional en todo momento, por sus consejos sobre hacer lo correcto siempre, por los ánimos que me brinda siempre a seguir adelante y siempre perseguir mis sueños.*

*A mis hermanos, por ser un ejemplo a seguir, por enseñar que no importa el tiempo que conlleva alcanzar una meta sino empezar a cumplirla, por estar conmigo a lo largo de la carrera brindándome su apoyo para continuar, pero sobre todo por estar conmigo siempre.*

*A mi tutor Ph.D. Leandro Rárama Aguilera, por brindarme el conocimiento para llevar a cabo esta investigación, por su paciencia y comprensión a lo largo de la carrera y del proyecto, por animarme con su ejemplo a llegar muy lejos, por ser una excelente persona y ejemplo a seguir.*

*A la Ing. Haysell Delgado, por ayudarme y apoyarme con sus conocimientos en el desarrollo de esta investigación, por estar siempre pendiente en cada etapa del proceso, por impulsarnos a continuar siempre y sobre todo por guiarnos con cariño hasta la culminación del proyecto.*

*Al Programa de Investigación y Servicios del Ambiente, por brindar los medios necesarios para que este proyecto se pudiese llevar a cabo.*

**Tatiana de los Ángeles López Martínez**

## AGRADECIMIENTO

*A Dios, porque cada día me levanta con un propósito, por la vida que me regala y por los sueños que se vuelven realidad con la fe en sus manos, por la sabiduría, fortaleza y salud que día a día demuestra su amor por mí.*

*A mis padres, por enseñarme a ser perseverante, porque gracias a ellos logro ver el fruto del esfuerzo y el trabajo constante, por siempre confiar en mí y estar para mí incondicionalmente desde que tengo memoria, por darme el amor y el cariño que siempre necesité para seguir adelante con mis metas.*

*A mi tutor Ph.D. Leandro Ráramo Aguilera, por ser el dador de su amplio conocimiento a lo largo de mi carrera y este inigualable proyecto, por siempre comprender las situaciones y ayudarnos a entender la base de la investigación, por ser el mejor tutor e inspiración a seguir.*

*A la Ing. Heysell Delgado, por acompañarme siempre de la mano en el trabajo duro de investigación, por entender y ayudarnos a superar cada fallo que se obtiene en la práctica a lo largo del trabajo, por ser más que una compañera, una amiga.*

*Al Programa de Investigación y Servicios del Ambiente, por prestar sus instalaciones para llevar a cabo proyectos donde se logra la superación personal y académica.*

**Ángeles Lucía Rodríguez Toruño**

## DEDICATORIA

*A Dios, por ser el pilar fundamental en mi vida y sin Él no hubiese sido capaz de haber logrado esta meta.*

*A mis padres, por guiarme siempre e impulsarme a salir adelante profesionalmente y por ayudarme a tener claras todas mis metas.*

*A mis hermanos, por su contribución en mi formación profesional, por explicarme como es la vida laboral e inculcarme valores a desempeñar en el mundo laboral.*

*A mi tutor Ph.D. Leandro Páramo Aguilera y a la Ing. Heysell Delgado, por darme la oportunidad de culminar mi carrera mediante este proyecto y por brindarme la enseñanza necesaria en la parte experimental en el desarrollo de la investigación.*

*A cada profesor de la Universidad Nacional de Ingeniería y a todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron a la culminación de mi carrera.*

**Tatiana de los Ángeles López Martínez**

## DEDICATORIA

*A Dios, porque en sus manos pongo con fe mi sabiduría y llevarme por el camino del éxito y la superación personal.*

*A mis padres, sin los no cuales existiría la persona que soy hoy, con las ganas de entrar al mundo laboral y competitivo, con la superación y las metas bien puestas en mi cabeza, por enseñarme que se gana caminando, no corriendo.*

*A mi tutor Ph.D. Leandro Páramo Aguilera, sin el cual no hubiera tenido la oportunidad de demostrar mis capacidades, por aceptarme a ser parte de sus proyectos biotecnológicos en base a mejoras en el ambiente.*

*A la Ing. Heysell Delgado, sin la cual no tendría las técnicas y conocimientos sobre experimentos en laboratorio, porque ella estuvo como yo en un momento y no existe mejor persona que sepa lo que se siente, que ella.*

*A la Universidad Nacional de Ingeniería, a cada profesor que me enseñó verdaderamente lo que era el estudio y esfuerzo, por ser las guías de quien soy hoy, a cada persona que fue participe a lo largo de mi carrera con el fin de culminarla con éxito.*

**Ángeles Lucía Rodríguez Toruño**

## OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA

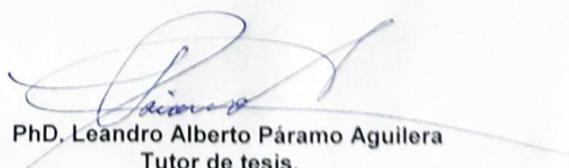
Managua, 20 de septiembre del 2021.

Por este medio me es grato presentar el trabajo titulado: "*Desarrollo de un proceso de producción de **Trichodermas** nativas previamente identificadas de diferentes regiones de Nicaragua*" y que fuera desarrollado por las bachilleras **Tatiana de los Ángeles López Martínez y ángeles Lucía Rodríguez Toruño**. Este trabajo nació como producto del desarrollo de un proyecto de investigación pionero en la UNI y puede decirse que en el país en general, el cual consiste en bioprospectar en busca de desarrollar una base microbiana para el desarrollo de múltiples bioprocesos.

Desde hace varios años se ha venido produciendo *Trichoderma* en nuestro país, principalmente por parte de la Universidad Nacional Agraria, de una empresa privada pequeña y de un colectivo de mujeres de la zona norte del país. Estas producciones han estado orientadas fundamentalmente a la especie *harzianum* y en algunos casos se han producido simplemente como *Trichoderma spp.* De la forma antes mencionada se han utilizado en el país para diferentes cultivos y más recientemente se ha venido introduciendo al país, una serie de marcas diferentes con productos de diferentes orígenes y haciendo énfasis en la especie *harzianum*. El proyecto bioprospección, inicialmente mencionado, produjo algunos aislados que posteriormente fueron identificados como *Trichodermas* y cuya base fue ampliada por medio del presente trabajo.

Es debido a lo antes expuesto que, como investigadores para el área de biotecnología, se propuso el aislamiento, identificación y desarrollo de la producción masiva de *Trichodermas*, buscando un sustrato que de buenos resultados sin competir con el alimento humano (Arroz) y que se pueda contar con diferentes especies cuya asociación a cultivos y regiones específicas este plenamente demostrada. Este proyecto cumplió cabalmente sus objetivos al desarrollar la etapa propuesta y obtener resultados sumamente prometedores. Debido a expuesto, solicito respetuosamente al honorable tribunal examinador, proceda a la defensa del presente trabajo para graduación de las bachilleras López Martínez y Rodríguez Toruño.

Atentamente



PhD, Leandro Alberto Páramo Aguilera  
Tutor de tesis.

## RESUMEN

Los hongos *Trichodermas* son de vital importancia para mantener los cultivos de plantas libres de hongos fitopatógenos gracias a su acción antagónica. El objetivo de esta investigación consistió en encontrar el mejor sustrato para la reproducción masiva de cepas de hongos *Trichodermas*, previamente aislados de suelos nicaragüenses. Primeramente, a las cepas aisladas en cultivos axénicos se les realizó diversos reconocimientos macro y microscópicos para determinar que corresponden a cepas de *Trichodermas* provenientes de dos lugares de aislamiento, con la cual 8 muestras de suelo eran de Terrabona, Matagalpa y 10 muestras de suelo eran de la ciudad de León. Todas las muestras provenían de cultivos y los aislados obtenidos contribuyeron a la ampliación de la base de datos de microorganismos del PIENSA.

Una vez las cepas aisladas, se procedió a realizar la identificación de estas por medio de la extracción del ADN genómico, la secuenciación con la empresa MACROGEN y un análisis filogenético de los hongos, la cual arrojó finalmente resultados que permitieron encontrar la especie de *Trichoderma* a la cual correspondían. Las cepas de *Trichodermas* previamente aisladas e identificadas por vía morfológica y molecular, fueron reproducidas masivamente por medio de diversos sustratos orgánicos como: arroz como testigo, maíz triturado, olote de maíz triturado y copra de coco. Estos sustratos fueron evaluados con una variante consistente en la adición de melaza al 5%. Una vez se tuvo el sustrato completamente lleno de esporas de hongos se procedió a cosecharlas manualmente en mallas finas y a su conteo final por medio de una cámara de Neubauer.

Como producto de los aislamientos realizados, se logró obtener 7 bacterias y 29 hongos filamentosos con 6 posibles hongos *Trichodermas* con base a sus características macro y microscópicas. De lo anterior, se identificó un *Trichoderma harzianum* (72TG-11) y 2 *Penicillium oxalicum* (20TG-01 y 51TG-15). De la base de aislados provenientes del PIENSA y que han sido obtenidos de trabajos previos, se identificaron 4 *Trichodermas harzianum* (T1, T2, T3 y CVD-06), 1 *Trichoderma sp.* (CIXD-11) y 1 *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12). De la reproducción masiva realizada a las mismas condiciones para las cepas de *Trichoderma* y los distintos sustratos (arroz como testigo, copra de coco, maíz y olote de maíz) se determinó que el olote de maíz arroja valores muy cercanos a los del arroz, como lo es en el caso del *Trichoderma harzianum* 72TG-11 donde se obtiene (sin melaza) el valor de  $3.30 \times 10^6$  en arroz y  $1.74 \times 10^6$  en olote; el exponencial no varía por lo que denota que el olote es un sustrato ideal para la reproducción de los hongos sin tener que utilizar alimento del ser humano (como en el caso del arroz).

Finalmente, y considerando el uso de la melaza, los hongos: *Trichoderma harzianum* (72TG-11), mostraron estimulación en su producción de esporas ante arroz y maíz triturado, e inclusive ante olote de maíz pasando de  $10^6$  sin melaza a  $10^7$  con melaza. *Trichoderma sp.* (CIXD-11), mostró resultados similares al anterior para todos los sustratos evaluados. Para otros como *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12), *Trichoderma harzianum* (T3) y *Trichoderma harzianum* (CVD-06), aparentemente la adición de melaza no mostró diferencias apreciables en cuanto al número de esporas.

Como un plus del presente trabajo, se logró aislar y caracterizar 7 bacterias y 29 hongos filamentosos (uno de los cuales resultó ser *Trichoderma harzianum*), los cuales pasaron a enriquecer la base de microorganismos aislados de los que dispone el PIENSA (algunos de los cuales ya fueron identificados en trabajos posteriores a este) y que se espera que una vez sean plenamente identificados estén disponibles para el desarrollo de futuros bioprocesos.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO .....	I
DEDICATORIA .....	III
RESUMEN .....	V
I. INTRODUCCION .....	14
II. JUSTIFICACION .....	16
III. OBJETIVOS .....	17
3.1. General .....	17
3.2. Específicos.....	17
V. MARCO TEÓRICO .....	18
5.1 Microorganismos.....	18
5.1.1 Clasificación de los microorganismos .....	18
5.1.2 Generalidades de los hongos <i>Trichodermas</i> .....	19
5.1.3 Características de los hongos <i>Trichoderma</i> .....	20
5.1.4 Ventajas de usar <i>Trichodermas</i> .....	21
5.1.5 Importancia del hongo <i>Trichoderma</i> como agente de biocontrol .....	22
5.1.6 Factores que afectan el crecimiento de los <i>Trichodermas</i> .....	22
5.1.7 Medios de Cultivo .....	23
5.1.8 Aislamiento de <i>Trichodermas</i> .....	23
5.1.9 Metodos de aislamiento .....	23
5.2 Identificación del hongo <i>Trichoderma</i> .....	24
5.2.1 Métodos Fenotípicos .....	24
5.2.2 Métodos Moleculares.....	27
5.3 Reproducción masiva de hongos <i>Trichodermas</i> .....	33
5.3.1 Cultivo monospórico .....	33
5.3.2 Sustratos .....	33
5.3.3 Proceso fermentativo.....	36

5.3.4	Cosecha de esporas.....	38
5.3.5	Conservación del producto final.....	38
5.3.6	Aplicaciones de algunos <i>Trichodermas</i> en la agricultura .....	39
VI.	METODOLOGIA.....	41
6.1	Muestreo y aislamiento de microorganismos.....	41
6.1.1	Localización de estudio .....	41
6.1.2	Descripción de los sitios de muestreo.....	41
6.1.3	Toma de muestras.....	41
6.1.4	Preparación de medios de cultivos .....	42
6.1.5	Inoculación de las muestras .....	43
6.1.6	Aislamiento microbiano.....	44
6.1.7	Identificación macro y microscópica de los microorganismos .....	45
6.1.8	Pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación macro y microscópica de los microorganismos .....	46
6.2	Identificación molecular.....	48
6.2.1	Extracción de ADN, PCR y secuenciación.....	48
6.2.2	Construcción del árbol filogenético .....	51
6.2.3	Conservación de los microorganismos .....	51
6.3	Preparación de medios de cultivos (sustratos orgánicos) y reproducción masiva de hongos <i>Trichodermas</i> .....	52
6.3.1	Preparación y esterilización de Tween 80 al 0.1%.....	52
6.3.2	Clarificación de mieles (Melaza) .....	52
6.3.3	Cultivo monospórico .....	53
6.3.4	Preparación de antibiótico .....	54
6.3.5	Preparación y esterilización de sustratos orgánicos .....	54
6.3.6	Inoculación de los diferentes sustratos para reproducción de las cepas 55	
6.3.7	Cosecha de esporas.....	56
6.3.8	Cuantificación de esporas.....	56
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	58
7.1	Muestreo y aislamiento .....	58
7.1.1	Toma de muestras.....	58

7.1.2	Inoculación de las muestras .....	60
7.1.3	Aislamiento y purificación de microorganismos.....	61
7.1.4	Pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación microbiana 65	
7.2	Identificación molecular de los hongos seleccionados .....	73
7.2.1	Extracción de ADN, PCR y secuenciación.....	73
7.2.2	Construcción del árbol filogenético .....	76
7.3	Preparación de medios de cultivo (sustratos sólidos) y reproducción masiva de hongos <i>Trichodermas</i> .....	82
7.3.1	Cultivo monospórico .....	82
7.3.2	Inoculación de los <i>Trichodermas</i> identificados en los sustratos orgánicos para la reproducción masiva.....	87
7.3.3	Cuantificación de esporas y evaluación de sustratos orgánicos .....	93
7.3.4	Dosificación de esporas.....	98
VIII.	CONCLUSIONES.....	100
IX.	RECOMENDACIONES.....	101
X.	BIBLIOGRAFIAS .....	102
XI.	ANEXOS .....	118

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 5.1. Esquema de la evolución del mundo vivo clasificado en el sistema de tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, basada en la estructura del ARN de los ribosomas propuesto por Carl R. Woese en 1978. ....	18
Figura 5.2. Características microscópicas de los hongos <i>Trichodermas</i> , donde se muestra la forma de sus hifas, su esporangio y sus esporas. ....	25
Figura 5.3. Morfología microscópica de las diferentes especies de <i>Trichodermas</i> . ....	26
Figura 5.4. Esquema del proceso de identificación microbiana por vía molecular, mediante secuencias del ADNr. ....	28
Figura 5.5. Etapas de técnica de extracción de ADN. ....	29
Figura 6.1. Muestras de suelo provenientes de Terrabona, Matagalpa y León. ...	42
Figura 6.2. Preparación de medios de cultivo. ....	43
Figura 6. 3. Técnica de siembra masiva en superficie. ....	44
Figura 6. 4. Técnica de siembra por estría aplicada para aislar las colonias bacterianas de los cultivos mixtos. ....	45
Figura 6. 5. Técnica de tinción de Gram para bacterias. ....	47
Figura 6. 6. Técnica de cinta adhesiva para la observación de esporas en los hongos filamentosos.. ....	48
Figura 6. 7. Ventana del programa BioEdit v7.0.9 para la corrección manual de bases en la secuencia. ....	49
Figura 6. 8. Archivo FASTA guardado luego de la corrección de errores. ....	50
Figura 6. 9. Fragmento del listado de secuencias reportadas en Gen Bank del NCBI con las que muestra homología la secuencia problema. ....	50
Figura 6. 10. Ventana del programa BioEdit v7.0.9. ....	51
Figura 6. 11. Preparación y clarificación de TWEEN 80 al 0.1%. ..	52
Figura 6. 12. Clarificación de melaza. ....	53
Figura 6. 13. Preparación de sustratos sólidos. ....	55
Figura 6. 14. Cosecha de esporas de los hongos. ....	56
Figura 6. 15. Vistas al microscopio de la Cámara de Neubauer. ....	57
Figura 7. 1. Inoculación de muestras de suelo. ....	60
Figura 7. 2. Representación de los cultivos axénicos. ....	64
Figura 7. 3. Morfología macroscópica de las bacterias en placa Petri y su observación microscópica con objetivo de 100x de la tinción de Gram. ....	66
Figura 7. 4. Morfología macroscópica de hongos filamentosos provenientes de Terrabona, Matagalpa y su observación microscópica de sus esporas con objetivo de 50x. ....	67
Figura 7. 5. Observación al microscopio con objetivo de 50x de hongos filamentosos. ....	70

Figura 7. 6. Morfología macroscópica de hongos filamentosos provenientes del banco de microorganismos del laboratorio de Biotecnología del PIENSA-UNI y su observación microscópica de las esporas con objetivo de 50x.....	71
Figura 7. 7. Extracción de ADN genómico en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Centroamericana (UCA) de las 12 muestras de hongos seleccionadas como posibles hongos <i>Trichodermas</i> . .....	74
Figura 7. 8. Árbol filogenético construido con el programa MEGAX64.. .....	79
Figura 7. 9. Proceso de obtención del cultivo monospórico.....	83
Figura 7. 10. Anverso y reverso del crecimiento radial de las cepas identificadas.. .....	84
Figura 7. 11. Curva de crecimiento radial de todos los hongos <i>Trichodermas</i> trabajados.....	85
Figura 7. 12. Proceso de reproducción masiva de los hongos <i>Trichodermas</i> en placas petri provenientes del cultivo monospórico. ....	86
Figura 7. 13. Observación microscópica con objetivo de 50x de las esporas de los hongos utilizados en la reproducción masiva antes de ser inoculadas. ....	87
Figura 7. 14. Proceso de inoculación de las esporas en los hongos en los sustratos.. .....	88
Figura 7. 15. Crecimiento masivo de las esporas de los hongos en los sustratos sin melaza.....	90
Figura 7. 16. Crecimiento masivo de las esporas de los hongos en los sustratos con melaza.....	92
Figura 7. 17. Cuantificación de esporas.. .....	94

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 5. 1. Aplicaciones biotecnológicas agrícola e industrial de algunos hongos <i>Trichodermas</i> .....	39
Tabla 7. 1. Resumen de las muestras de suelo provenientes de Terrabona, Matagalpa y León con fecha y área de muestreo. ....	59
Tabla 7. 2. Consolidado de los cultivos axénicos bacterianos y fúngicos aislados procedente de las muestras de Terrabona, Matagalpa y su respectiva codificación.....	62
Tabla 7. 3. Consolidado de los cultivos axénicos bacterianos y fúngicos aislados procedente de las muestras de León y su respectiva codificación. ....	62
Tabla 7. 4. Características Macro y Microscópicas de los hongos filamentosos aislados de Terrabona, Matagalpa.....	69
Tabla 7. 5. Resumen de la selección de posibles hongos <i>Trichodermas</i> del laboratorio de Biotecnología del PIENSA con sus respectivas características Macro y Microscópicas que fueron enviados al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana (UCA).....	72
Tabla 7. 6. Hongos seleccionados para la amplificación de PCR, mediante la compañía MACROGEN..	75
Tabla 7. 7. Resumen de los 9 hongos secuenciados para la construcción del árbol filogenético. ....	77
Tabla 7. 8. Identificación molecular de 9 cepas de hongos filamentosos..	80
Tabla 7. 9. Resultados de concentración de esporas en conidios/g en todos los <i>Trichodermas</i> de trabajo. ....	95

# Desarrollo de un proceso de Producción de *Trichodermas*

## I. INTRODUCCION

Existe una familia de hongos llamados *Trichodermas* que han demostrado ser de alto control biológico en cuanto a plagas en diversos cultivos de plantas, gracias a su acción antagónica ante fitopatógenos del suelo como lo son los hongos del género *Fusarium*. Durante los últimos años, se ha mostrado gran interés en estudiar el potencial de *Trichoderma* de parte de varios investigadores y algunas empresas, caracterizando dicho hongo como un controlador biológico de patógenos del suelo. Los hongos del género *Trichoderma sp.* son un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en suelos agrícolas, con abundante materia orgánica en descomposición y alta densidad de raíces. *Trichoderma sp.* se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, y también se encuentra en Nicaragua en grandes cantidades (Castillo, 2020).

Diversos estudios realizados anteriormente, caracterizan al hongo previamente aislado, demuestran que los mecanismos utilizados para dicho proceso consisten en un reconocimiento de crecimiento de estructuras microscópicas (hifas, esporas y clamidosporas) y macroscópicas (color de micelio, forma de micelio y crecimiento). Asimismo, las características macro y microscópicas fueron cotejadas con las claves de identificación de géneros de Deuteromycetes (Gams & Brisset, 1998), para especies de *Trichoderma* (Girard, 1964) y la clave interactiva de la APS (Sammuels, *et al.*, 1996).

Para la reproducción de esporas de *Trichoderma sp.* en medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA) presenta un crecimiento colonial rápido de 3 días entre 25-30°C. En este medio, las colonias son de aspecto algodonoso que se compactan con el tiempo. Cuando su desarrollo es alternado con períodos de luz y oscuridad, se aprecian las zonas de crecimiento correspondiente a cada período. En ausencia de luz el micelio es de color blanco algodonoso y en presencia de luz se observa la esporulación con tonalidades verdosas, dando la apariencia de anillos en forma concéntrica. Al crecer en medio de cultivo, se observa en el reverso de la caja, un color pálido y en ocasiones una pigmentación amarillenta (Windham, *et al.*, 1986).

En el caso de evaluación de distintos sustratos para la reproducción de *Trichodermas* se realizó con el fin de obtener el mejor de ellos en cuanto a producción de esporas y que sobre todo que éste no sea de consumo humano, así mismo, se analizó la incidencia de algunos factores que afectan directamente el crecimiento de biomasa de una cepa de *Trichoderma sp.* en fermentación sólida y bifásica, como por ejemplo las condiciones de luz, humedad, temperatura, etc., los sustratos evaluados son Arroz como testigo, Maíz triturado, Olote de maíz triturado y Copra de coco, cabe mencionar que estos sustratos se utilizaron tanto en la

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

variante sin melaza como en la variante con melaza. Chávez, *et al.*, 2009, probaron sustratos como: arroz 53% (p/p), arroz 53% (p/p)-melaza 3% (p/p) y arroz 53% (p/p)-melaza 10% (p/p) en agua destilada, con incubación 25°C y períodos de luz constante y fotoperiodos 24 h luz/24 h oscuridad durante 8 días. Los parámetros estimados fueron densidad poblacional (conidios/mL), germinación de esporas a 24 horas y porcentaje de pureza. Los resultados indicaron que el proceso de fermentación sólida empleando como sustrato arroz-agua destilada a 25°C y la exposición constante a la luz permitió mayor recuperación de conidios ( $40 \times 10^{16}$  conidios/mL), con 92% de germinación a 24 horas y una pureza estimada de 92.30%. Por otro lado, García, *et al.*, 2006 y Agamez, *et al.*, 2008, utilizaron melaza para la reproducción de biomasa de *Trichodermas* obteniendo valores entre  $10^8$  y  $10^9$ , sin embargo para obtener un buen crecimiento adicionan levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y en otros casos Urea.

El objetivo principal de esta investigación se basa en encontrar el mejor sustrato para la producción de esporas de los hongos *Trichodermas* en grandes cantidades, así mismo, analizar el comportamiento de crecimiento mediante la adición de melaza al 5% a los sustratos, donde posteriormente las esporas obtenidas se puedan aplicar al campo para hacer uso de todos los beneficios que poseen los hongos del género *Trichodermas*.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

### II. JUSTIFICACION

A lo largo del avance tecnológico, los procesos de estudios de la naturaleza, se realizan con el fin de encontrar sustancias u organismos que puedan ser utilizados para el beneficio del ser humano, el género de hongos *Trichoderma* ha sido muy mencionado por la industria agrícola, gracias a sus principales características que ayudan a fortalecer los cultivos.

Gracias a la capacidad de los hongos *Trichoderma* de fácil aislamiento y cultivo, demuestra también un crecimiento rápido en gran número de sustratos, y sumando la resistencia y persistencia que posee dicho hongo en cultivos y cosechas, promueve una continua investigación y análisis en estudios de control biológico para las plantas.

Por tanto, por medio de la presente investigación se prevé obtener un buen número de aislados, que luego serán caracterizados e identificados de ser posible hasta nivel de especie. La finalidad de esta investigación, también conlleva demostrar cuál sería el mejor sustrato orgánico de entre algunos previamente seleccionados (Copra de coco, olote de maíz, maíz, además de arroz como testigo) para la reproducción masiva de las especies que fueron identificadas anteriormente, midiendo la respuesta en número de conidios por gramo de muestra o por mL de solución.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

### III. OBJETIVOS

#### 3.1. General

Desarrollar el proceso productivo de *Trichodermas* en la UNI por medio de la evaluación de diferentes sustratos orgánicos para cepas previamente identificadas por vía molecular entre el 2019-2020.

#### 3.2. Específicos

Ampliar la base de aislados de *Trichoderma* que dispone el laboratorio de Biotecnología del PIENSA.

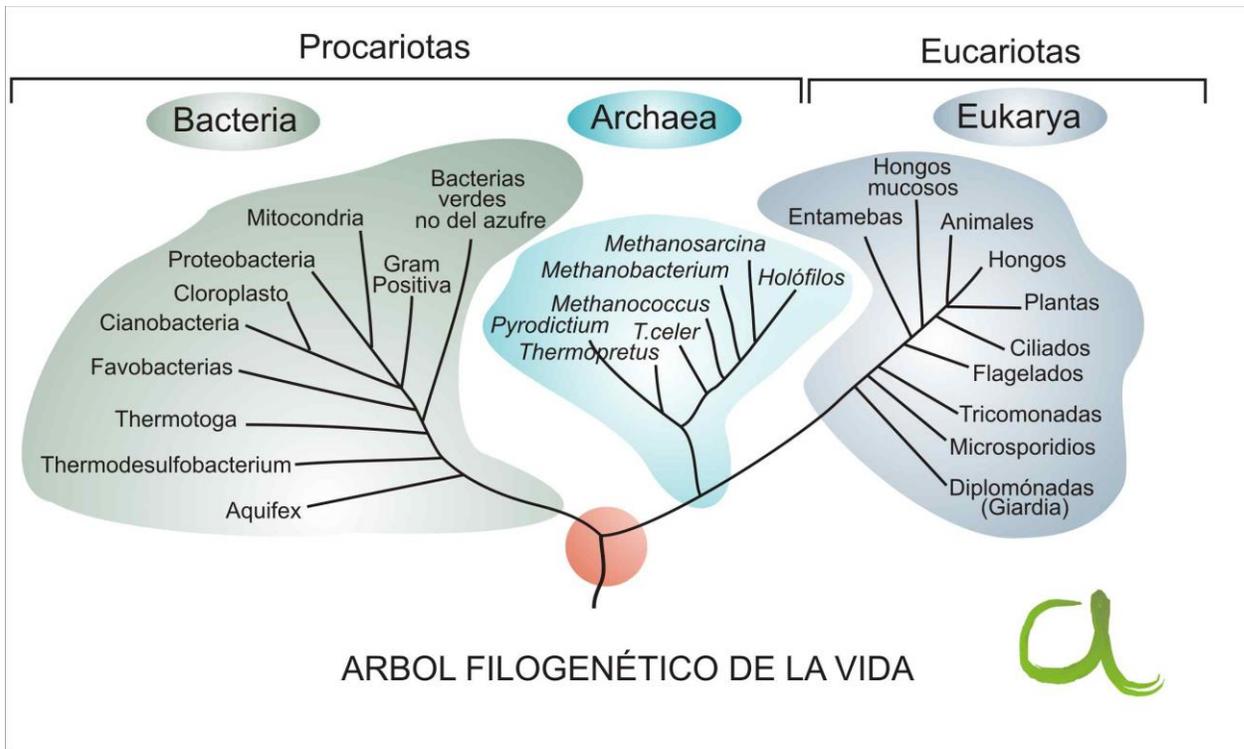
Identificar el material existente de aislados procedentes de muestreos realizados en la zona de Terrabona, Matagalpa.

Comparar los diferentes sustratos orgánicos Arroz, Maíz, Olote de maíz, copra de coco y melaza, con vistas a obtener el mejor de ellos en producción de esporas para el desarrollo masivo de la reproducción de las especies de *Trichoderma* previamente identificadas a escala de laboratorio.

V. MARCO TEÓRICO

5.1 Microorganismos

Los microorganismos se agrupan en dos categorías: Procarióticos y eucarísticos. En la primera están las archaeas y las bacterias, y en el segundo están hongos, algas y protozoarios (Montaño, *et. al.*, 2010). La amplia variedad de microorganismos existentes en el mundo, son apreciables gracias a la diversidad que se encuentran ya sea por sus características macroscópicas y microscópicas de cada microorganismo existente. Los microorganismos participan en procesos ecológicos que permiten el funcionamiento de los ecosistemas y también en procesos biotecnológicos que son esenciales para la industria farmacéutica, alimenticia y médica, dado a que los microorganismos son los principales responsables de la descomposición de la materia orgánica y de ciclaje de nutrientes. En la **Figura 5.1** se muestra un esquema de la evolución del mundo vivo basado en la estructura del ARN de los ribosomas.



**Figura 5.1.** Esquema de la evolución del mundo vivo clasificado en el sistema de tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, basada en la estructura del ARN de los ribosomas propuesto por Carl R. Woese en 1978 (Tortora, *et al.*, 2007).

5.1.1 Clasificación de los microorganismos

Los microorganismos se clasifican en cuatro grupos: Bacterias (las paredes celulares contienen un complejo de proteína-hidrato de carbono denominado

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

peptidoglucano), Archaea (presenta pared celular, pero carecen de peptidoglucano), Eukarya (incluye protistas: mohos mucosos, protozoos y algas y hongos: levaduras unicelulares, mohos multicelulares y setas) y parásitos (virus); cada uno de ellos tienen aspectos muy diferentes desde su estructura y morfología, hasta la nutrición y reproducción de ellos (Vargas y Villazante, 2014).

### **5.1.2 Generalidades de los hongos *Trichodermas***

En la presente investigación los microorganismos de interés son los hongos, entre ellos existen innumerables familias de hongos distintas, principalmente se encuentran los *Trichodermas* que es el objetivo principal de la misma. Este hongo es anaeróbico y habitante natural del suelo, las especies del género *Trichoderma* representan un grupo de hongos filamentosos, que de acuerdo con Kulhs, *et al.*, 1997; Lieckfeldt, *et al.*, 1999; Samuels & Chaverri, 2003; Samuels, 2005 y Jaklitsch, *et al.*, 2006, la clasificación taxonómica del género *Trichoderma* es Reino *Mycetae* (Fungi), División *Eumycota*, Subdivisión *Ascomycotina*, Clase *Euascomycetes*, Orden *Hypocreales*, Familia *Hypocreaceae* y Género *Trichoderma* e *Hypocrea*. Estos hongos se caracterizan por predominar en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Zhang, *et al.*, 2005).

Algunas especies son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas, y otras son micoparásitas. Además, pueden colonizar distintos ambientes, debido a su alta capacidad reproductiva (Bissett, 1991; Harman, *et al.*, 2004). Los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica y su humedad, sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden y Scattolin, 1988; Jackson, *et al.*, 1991).

De manera particular, los hongos del género *Trichoderma* se pueden encontrar en la rizósfera, donde son capaces de competir por nutrientes y espacio con otros microorganismos. Además, este grupo fúngico es importante para las plantas, al contribuir en el control de hongos fitopatógenos ya que poseen propiedades micoparásitas y antibióticas, por lo que algunas especies han sido catalogadas como excelentes agentes de control biológico de hongos causantes de enfermedades para diferentes plantas hortícolas (Score & Palfreyman, 1994; Druzhinina & Kubicek, 2005; Ávila, *et al.*, 2006), gracias a su capacidad para excretar enzimas exógenas que les permiten actuar como biopesticidas.

Las cepas de *Trichoderma* (*T*) más comercializadas para el control biológico son *T. viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*, la cuál es la más utilizada y reportada en la literatura (Harman, 2000; Ávila, *et al.*, 2006). Los hongos del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar enzimas como polisacaridasas, celulasas,

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

xilanasas y quitinasas, las cuales se han aprovechado en procesos industriales (Kubicek & Harman, 1998; Verma, *et al.*, 2007).

La explotación comercial de estas enzimas es diversa, ya que se emplean para producir detergente de ropa, aceite de oliva, vino, cerveza, jugos, alimentos para animales y en la producción de algunos combustibles (Reese & Manels, 1989; Galante, *et al.*, 1993; Walsh, *et al.*, 1993; Verma, *et al.*, 2007). Por ejemplo, las celulasas de *T. reesei* se utilizan en el blanqueo de pulpa de papel, y son una alternativa amigable al convencional blanqueo con cloro, evitando el problema ambiental del cloro generado por dicho proceso (Buchert, *et al.*, 1994). Las especies del género *Trichoderma* pueden producir diversos metabolitos secundarios dentro de los que se encuentran algunas toxinas como la gliotoxina (Brian, 1944; Di Pietro, *et al.*, 1992) y hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas (Kliefeld & Chet, 1992). Así, *T. harzianum* y otras especies del género son capaces de incrementar el crecimiento de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) (Lynch, *et al.*, 1991). Su papel como promotor de crecimiento vegetal se debe a la capacidad de colonizar rápidamente las raíces de la planta protegiéndolas del ataque de fitopatógenos, lo que se traduce en un incremento en el crecimiento y por la exudación de fitohormonas o la solubilización de fosfatos, Fe, Mn, Mg (Acurio y España, 2017).

Las especies de *Trichoderma sp.* son muy usadas en el control biológico de hongos fitopatógenos, especialmente de aquellos que atacan a partes subterráneas de los vegetales, ejerciendo un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas haciéndolas más vigorosas y con mejor desarrollo del sistema radicular, además aumentan los mecanismos de defensa de las plantas (Vallejo, 2014); por otro lado, se ha demostrado que *Trichoderma sp.* también puede controlar nematodos, permitiendo que los agricultores empleen *Trichoderma sp.* no solo como hongo antagonista, sino también como hongo nematófago, haciendo de esta manera que los costos del tratamiento de sus cosechas disminuyan ya que solo necesitarían aplicar un solo tipo de controlador biológico que además se adapte a las condiciones ambientales (Infante, *et al.*, 2009).

### *5.1.3 Características de los hongos Trichoderma*

- Se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas.
- Se pueden encontrar en diferentes zonas y hábitats, especialmente donde existe materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así como en residuos de cultivos.
- Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales coloniza rápidamente. Esta capacidad de adaptación a

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

diversas condiciones ambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos para su reproducción.

- *Trichoderma* es un hongo anaerobio facultativo.
- La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, después se torna a verde oscuro o amarillento, como consecuencia de una densa esporulación.
- Produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas (conidias). Las esporas son los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol.
- Los *Trichodermas* son capaces de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina, celulosa entre otros, y emplearlos para su crecimiento gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas entre otras).
- Los *Trichodermas* asimilan como fuente de nitrógeno compuesto tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio.
- Es un hongo con una alta capacidad de tolerar un amplio rango de temperaturas, presentando una amplia distribución ecológica. Los valores óptimos para su crecimiento y esporulación oscilan alrededor de los 25°C a 30 °C (Papavizas, 1985).
- Un factor importante a tener en cuenta durante la reproducción es la conveniencia de periodos alternados de luz y oscuridad, que favorecen la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos (Medina, 2016).

### *5.1.4 Ventajas de usar Trichodermas*

Es importante mencionar que los *Trichodermas* son una especie que provee mucho beneficio a la tierra, algunas de las ventajas de utilizar estos hongos son:

1. Ayuda a descomponer materia orgánica, haciendo que los nutrientes se conviertan en formas disponibles para la planta, por lo tanto tiene efecto indirecto en la nutrición del cultivo.
2. Estimula el crecimiento de los cultivos porque posee metabolitos que promueven el desarrollo en las plantas.
3. Este hongo puede ser aplicado en compostaje (productos obtenidos a partir de diferentes materiales de origen orgánico), los cuales son sometidos a procesos de control biológico donde se obtienen altas cantidades de microorganismos benéficos cumpliendo de esta forma su función como biofungicida.
4. Tiene una función muy importante de preservación del medio ambiente al disminuir el uso de fungicidas químicos.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

5. Favorece la proliferación de organismos benéficos en el suelo como lo son otros hongos antagónicos.
6. Se propaga en el suelo aumentando sus poblaciones y ejerciendo control duradero en el tiempo sobre hongos fitopatógenos.
7. Tienen un amplio rango de acción y un control eficaz de enfermedades de plantas o cultivos.
8. Regula patógenos de la raíz (*Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*) y del follaje (*Botrytis*, *Mildew*), etc. (Chavarría, 2016).

### **5.1.5 Importancia del hongo *Trichoderma* como agente de biocontrol**

Las especies de *Trichoderma* predominan en ecosistemas terrestres (bosques o suelos agrícolas), tienen bajo requerimiento nutricional pero relativamente amplio rango de temperatura (25-30°C) para su crecimiento (Sandle, 2014). Además, poseen alta adaptabilidad a condiciones ecológicas y pueden crecer de manera saprófita, interactúan con animales y plantas (Zeilinger, *et al.*, 2016), y se desarrollan en diversos sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura (Ramos, *et al.*, 2008). Es por ello que el estudio de la diversidad de especies de *Trichoderma* en diversos hábitats naturales, permite ampliar el conocimiento sobre su aporte biotecnológico, y su importancia ecológica y agrícola (Jaklitsch & Voglmayr, 2015; Torres, *et al.*, 2015).

### **5.1.6 Factores que afectan el crecimiento de los *Trichodermas***

Los *Trichodermas* son hongos que, como se dijo anteriormente, crecen en la tierra, por lo que son capaces de crecer en condiciones de mucho estrés para ellos, ya que la tierra no siempre mantiene a la misma temperatura, humedad, etc. Es por esto que existen diversos factores que afectan el crecimiento de estos hongos, ya sea para que vivan plenamente en condiciones favorables o en condiciones difíciles. Los factores más importantes serán descritos a continuación.

- Luz: Se sabe que *Trichoderma* es fotosensible (Domsch, *et al.*, 2008) y se comporta mejor con condiciones de luz del día o UV tipo A (366 nm) (Da Fonseca, 1998). Como reporta Moore, 1996, la luz afecta específicamente la esporulación de muchos hongos, de tal forma que puede inhibir o estimular la producción de propágulos, y al igual que lo propuesto por este autor, la luz posee un especial efecto estimulante en la producción de esporas en algunas especies de *Trichoderma*, ya que la exposición periódica a la luz genera una distribución constante y uniforme de conidios en el medio, mientras que la oscuridad si bien no afecta de manera negativa el crecimiento de este hongo, no estimula el proceso de producción de conidios (Betina, 1995; Chávez, *et al.*, 2009).
- Humedad: Aunque la luz es un factor sumamente favorable cuando se trata de la reproducción del *Trichoderma*, la humedad es un factor muy importante

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

a tomar en cuenta. Según Villegas, 2019, la alta presencia de humedad y el riego mejora las condiciones de vida de muchos microorganismos entre ellos *Trichoderma*, pasando de un estado latente a uno activo y desarrollándose óptimamente hasta en un 60 % de plena capacidad del suelo de retención de humedad. A porcentajes mayores de saturación se disminuye la colonización y sobrevivencia por la baja disponibilidad de oxígeno, por lo que es necesario tener un porcentaje óptimo de humedad que no sature el crecimiento del hongo pero también que sea el suficiente para que se desarrolle plenamente.

- Temperatura: Según Martínez, *et. al.*, 2013, las temperaturas entre 25 y 30 °C están relacionadas con mayor crecimiento y desarrollo de las especies *Trichoderma*, aunque pueden crecer incluso a altas temperaturas de 35 °C.

### 5.1.7 Medios de Cultivo

Un medio de cultivo es una preparación líquida o sólida utilizada para el crecimiento, transporte, o mantenimiento de microorganismos. Si se desea utilizar para el crecimiento, deberá contener todos los nutrientes esenciales para ese microorganismo en concreto. Además, se utiliza frecuentemente para seleccionar y cultivar microorganismos específicos o para facilitar la identificación de una especie en particular. En estos casos, la función de un medio estará también determinada por su composición (Prescott, *et al.*, 2002). Un microorganismo necesita para crecer nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en autótrofos si es el CO<sub>2</sub> atmosférico (microorganismos que fotosintetizan) y heterótrofos si utilizan carbono orgánico. La fórmula elemental de un microorganismo es, aproximadamente C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N. Lo que supone que los componentes de las células son: carbono que representa alrededor del 50% del peso seco, oxígeno (32%), nitrógeno (14%), fósforo (3%), azufre (en torno al 1%) y otros elementos traza entre los que se encuentran Fe, K, Mg, Mn, Co, Mb, Cu y Zn, Ca, Na, Cr, Ni, Se, V, W (Madigan, *et al.*, 2009).

### 5.1.8 Aislamiento de *Trichodermas*

El aislamiento es la separación de un determinado microorganismo del resto de los microorganismos que lo acompañan, para esto existen diversos métodos de aislamiento, así como también medios de cultivo para la reproducción de microorganismos.

### 5.1.9 Metodos de aislamiento

#### 5.1.9.1 Método de siembra por estría en placas

Es el método más fácil y más usado para obtener cultivos axénicos. Para ello, se toma una muestra de la población mixta y a continuación se hacen estrías sobre la superficie de un medio sólido preparado en una placa Petri. Conforme se van creando estrías en zigzag con el asa, cada vez se van depositando en la superficie

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

del medio menos microorganismos. El asa se flamea brevemente y se vuelve a sembrar solo con los restos de microorganismos que ya quedaron en la placa, para de esta forma obtener colonias separadas (Santambrosio y Ortega, 2009).

### 5.1.9.2 Método de vertido en placa y extensión en placa

En este método la suspensión de células microbianas se diluyen antes de su siembra en placa. Esta técnica se lleva a cabo cuando la muestra contiene muchos microorganismos, de tal forma que la dilución no se puede realizar en una sola etapa donde es posible implementar una serie de diluciones seriadas. Las muestras diluidas se mezclan con agar fundido y se vierten en placa. Algunas colonias quedarán embebidas en el agar y otras crecerán en la superficie. Las colonias superficiales se extenderán y serán más grandes. Por otra parte, el método de la extensión las muestras diluidas se siembran directamente en la superficie de la placa de agar, extendiéndolas con ayuda de un asa de digralsky de cristal estéril. La suspensión se absorbe en el agar, dejando las células microbianas sobre la superficie. En ambas técnicas las placas se incuban hasta la aparición de las colonias (Rojas, 2011).

Como en el método de siembra por estría, no existe la seguridad de que las colonias que aparecen en las placas sembradas por extensión o en el agar solidificado sembrado por el método del vertido en placas sean cultivos axénicos hasta que se repita el proceso. Las dos técnicas de siembra por dilución presentan la ventaja de que permiten obtener un mayor número de colonias aisladas que el método de siembra por estría, por tanto se eligen cuando se ha de seleccionar una cepa a partir de una mezcla con varios tipos de microorganismos.

## 5.2 Identificación del hongo *Trichoderma*

La identificación microbiana es el proceso por el cual se delinean las características importantes de un microorganismo. Una vez establecidas estas características el perfil se compara con los de otros microorganismos caracterizados con anterioridad. Se utiliza una amplia variedad de métodos y criterios para establecer la identidad de microorganismos. Estos métodos por lo común pueden separarse en dos categorías generales: características genotípicas y características fenotípicas (Forbes, *et al.*, 2007).

### 5.2.1 Métodos fenotípicos

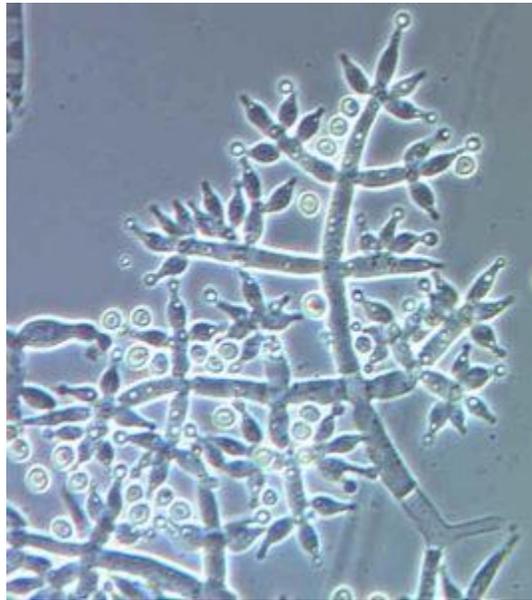
Los criterios fenotípicos se basan en características físicas o metabólicas observables, es decir la identificación se realiza mediante el análisis microscópico de sus estructuras más que de los genes en sí mismo (Forbes, *et al.*, 2007). En la **Figura 5.2** y **5.3** se muestran las características microscópicas más importantes de los hongos *Trichodermas*. Las estructuras de sus hifas son similares, sus esporas pueden ser redondas u ovaladas y su esporangio único característico de este género que son en forma de botella (Sánchez, 2009).

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

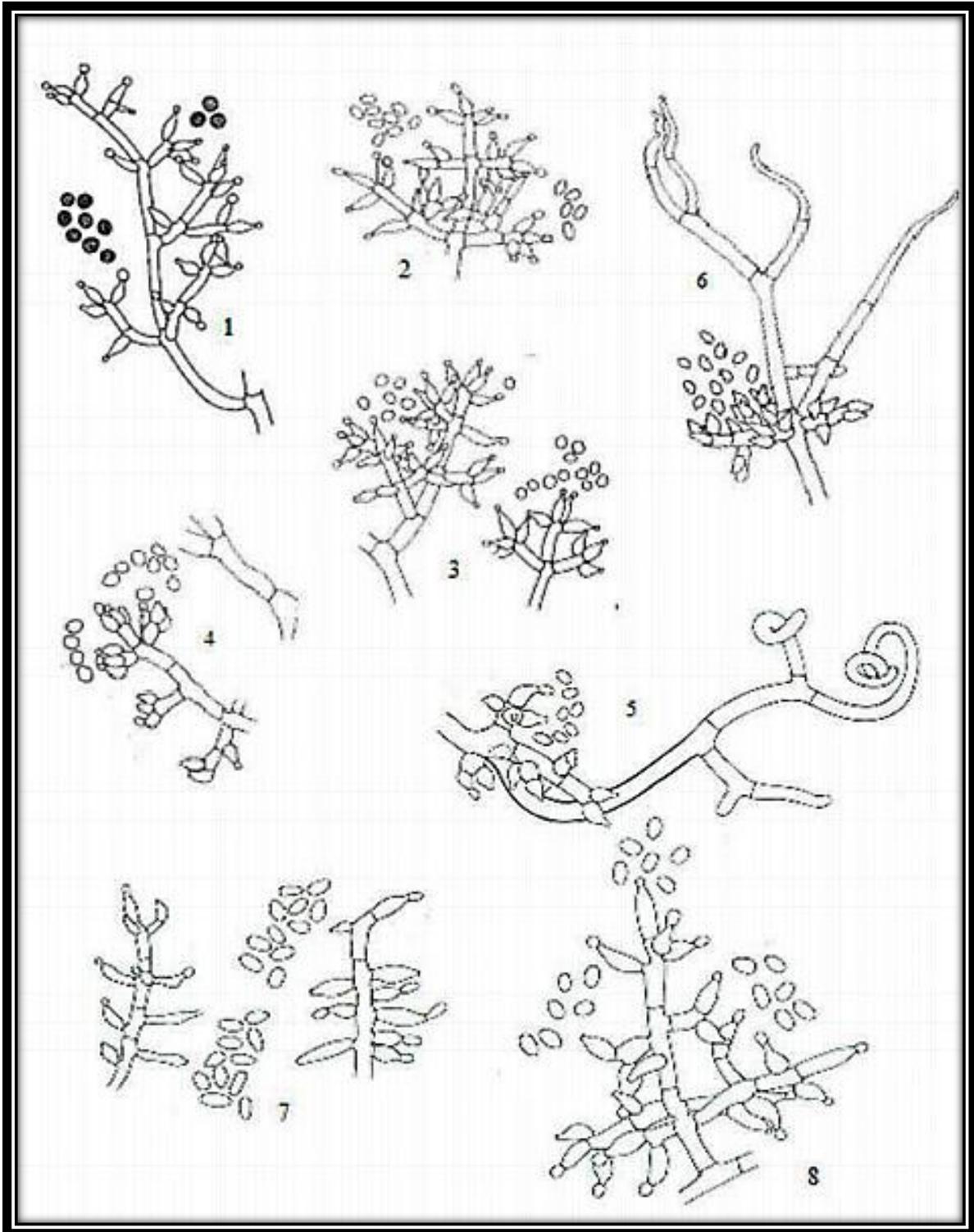
Una de las características microscópicas a considerar para la identificación de hongos son las siguientes:

- Si se trata de hongos levaduriformes se hace una preparación entre lámina y laminilla semejante a la realizada con las bacterias.
- Si se trata de hongos filamentosos la observación de esporas se realiza por medio de la prueba de la cinta pegante.

En raras ocasiones se usan colorantes para hongos o la observación de sus esporas y estructuras del mismo se hace mediante gota en fresco, el procedimiento es similar a la de los hongos levaduriformes (Pelzcar, 1997).



**Figura 5.2.** Características microscópicas de los hongos *Trichodermas*, donde se muestra la forma de sus hifas, su esporangio y sus esporas (Sánchez, 2009).



**Figura 5.3.** Morfología microscópica de las diferentes especies de *Trichodermas*. 1: *Trichoderma viride*, 2: *Trichoderma koningii*, 3: *Trichoderma harzianum*, 4: *Trichoderma virens*, 5: *Trichoderma polysporum*, 6: *Trichoderma hamatum*, 7: *Trichoderma longibrachiatum* y 8: *Trichoderma pseudokoningii* (Sánchez, 2009)

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

### 5.2.2 Métodos moleculares

Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), los métodos moleculares han surgido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. Los métodos de identificación molecular implican la caracterización de alguna porción del genoma bacteriano por medio de técnicas moleculares para el análisis del ADN o el ARN. Esto por lo general determina la presencia de un gen o una parte de él o de un producto del ARN que es específico de determinado microorganismo (Fernandez, *et al.*, 2010).

Las herramientas moleculares predominantes que se utilizan, son los métodos de RFLP (Polimorfismo de longitud fragmentos de restricción), RAPD (polimorfismo de ADN amplificado al azar), AFLP (Amplificación de fragmentos de longitud polimórficos) método genotípico basado en la amplificación de grupos de fragmentos de ADN selectos, obtenidos a partir de una digestión enzimática (Hogers, *et al.*, 1995), es una técnica altamente discriminatoria y reproducible, utilizado en diversos microorganismos (Lieckfeldt, *et al.*, 1999). También se utiliza la secuenciación de ADN ribosomal, con las secuencias del transcrito interno (ITS) 1 y 4 de ADN ribosomal, estas se comparan con las ya reportadas en las bases de datos, en la mayoría de los casos se utiliza el tradicional banco de datos del NCBI por sus siglas en inglés (National Center for Biotechnology Information), a través del método BLAST, en el cual se identifican las especies comparando la secuencia con las ya reportadas y según el mejor hit o grado de identidad (ej. >98%) se determina la especie (Druzhinina, *et al.*, 2006). La técnica de identificación molecular mediante el análisis del ARNr 16S y otros genes, se basa en la amplificación genómica y secuenciación de esos genes o sus fragmentos (**Figura 5.4**). El medio de cultivo o las condiciones de incubación no son factores determinantes, pero si son factores críticos para la técnica de extracción del ADN y la amplificación. Los análisis moleculares de ADN implican desde la reacción de cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) hasta el análisis bioinformático (Rodicio y Mendoza, 2004).

Algunas veces las secuencias ITS no logran una identificación definitiva, debido a la falta de polimorfismo en algunas especies. En estos casos se utilizan otras secuencias como la del factor de elongación de la traducción que es usada para obtener datos sobre la distancia genética más adecuada entre la especie objetivo y sus parientes más cercanos en niveles intercladal o niveles intergrupo del género *Trichoderma* (Druzhinina, *et al.*, 2006). Otro gen utilizado es el fragmento codificador de la segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II que cataliza la

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

síntesis de ARN mensajero en el núcleo de las células eucariotas y muestra valiosa información evolutiva (Marwi, 2013).



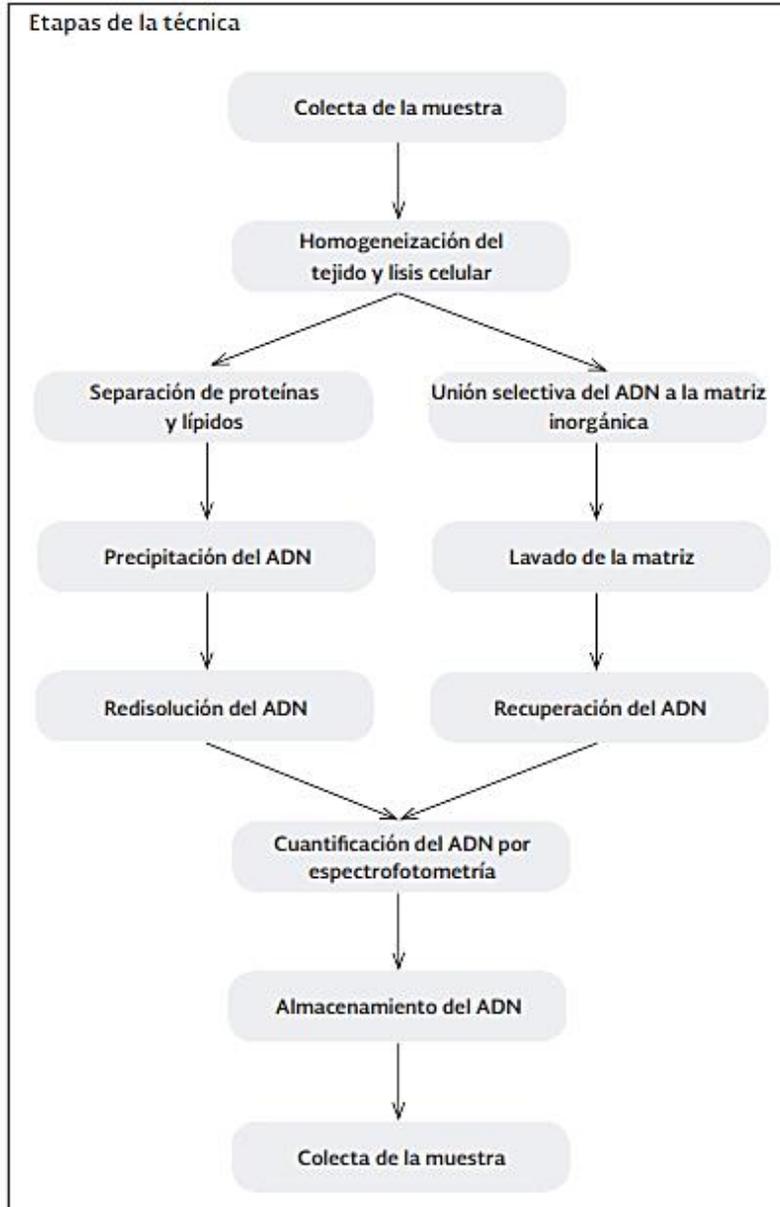
**Figura 5.4.** Esquema del proceso de identificación microbiana por vía molecular, mediante secuencias del ADNr (Delgado y Fonseca, 2019).

### 5.2.2.1 Extracción de ADN

La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro. La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal. A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y una vez suspendido en la fase acuosa se aísla por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

pasos que deben realizarse. En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Alejos, *et al.*, 2014). En la **figura 5.5** se puede observar las etapas de la extracción de ADN esquematizadas.



**Figura 5.5.** Etapas de técnica de extracción de ADN. (Alejos, *et al.*, 2014).

### 5.2.2.2 Amplificación de ADN

El PCR permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. En un termociclador, el ADN se utiliza como molde para la amplificación por PCR de una secuencia del ARNr 16S con un rango de tamaño entre 400-600 pb (o de otro tamaño si se analizan otros genes), con

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

oligonucleótidos (primers por su nombre en inglés) de amplio espectro complementarios a las regiones conservadas, que amplificaría teóricamente el gen ARNr 16S en todas las bacterias.

Los oligonucleótidos actúan como cebadores para la síntesis in vitro del ADN, la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada Taq polimerasa. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79-85°C). Ninguno de los oligonucleótidos o cebadores utilizados en la actualidad se considera totalmente universal, por lo que no se puede realizar una recomendación específica de cebadores que garanticen la amplificación de todos los procariotas (Acuña, 2015; Rodicio y Mendoza, 2004).

### 5.2.2.3 Secuenciación de ADN

La secuenciación es el análisis del orden exacto de los nucleótidos en una cadena corta de ADN, actualmente los métodos más utilizados son el de secuenciación automática y el método enzimático de terminación de cadena de Sanger también conocido por el método didesoxi. Hoy en día, el método más usado para la secuenciación de ácidos nucleicos es el método de Sanger. Sin embargo, es justo decir que el método de Maxam-Gilbert es el más adecuado para determinar la secuencia de fragmentos cortos de ADN, debido a que puede determinar la secuencia desde la primera base. En cambio, el método de Sanger sólo permite la lectura a partir de la base 10-20, este método se basa en el uso del ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico (Tahara, *et al.*, 1990).

El análisis de la secuencia de ADN, es el descubrimiento de similitudes funcionales y estructurales, y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas. Este análisis incluye la alineación de secuencias, la búsqueda en la base de datos de secuencias, el descubrimiento de patrones, la reconstrucción de las relaciones evolutivas, y la formación y la comparación del genoma (Meneses, *et al.*, 2011).

### 5.2.2.4 Análisis bioinformático

La bioinformática es el campo que se ocupa del manejo y análisis de los datos biológicos utilizando ordenadores. En el contexto de la genómica se centra en las secuencias de ADN y proteínas. Las secuencias de ADN se almacenan en grandes bases de datos, una de las más grandes bases de datos genómicos es la biblioteca internacional de ácidos nucleicos, a menudo denominada GenBank (Prescott, *et al.*, 2002). El análisis de secuencias incluye búsqueda en las bases de datos, alineamiento de secuencias, descubrimiento de motivos y patrones en proteínas, predicción de genes y regiones promotoras, regulación, reconstrucción de

relaciones evolutivas, ensamblaje de genomas y su comparación (Xiong, 2006). Es por ello que existen diversas bases de datos biológicas y herramientas gratuitas que permiten buscar, visualizar, editar y analizar secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

### **Bases de datos biológicas**

Una base de datos es un archivo computarizado usado para almacenar y organizar la información en registros estructurados, de manera que pueda ser recuperada fácilmente a través de diferentes criterios de búsqueda. Para recuperar la información de un registro, conocido también como entry, el usuario especifica una parte particular de la información, con lo cual se recupera el registro completo de la data (Xiong, 2006).

Actualmente, existen numerosas bases de datos biológicas disponibles en la Web. Una de las primeras bases de datos creadas fue Protein Data Bank (PDB) en el año 1971, donde se encuentra depositada la información de estructuras tridimensionales de moléculas biológicas, incluyendo proteínas y ácidos nucleicos, determinadas mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear. El entendimiento de la forma de estas moléculas permite deducir el rol de las mismas en enfermedades, así como pueden ser utilizadas para el desarrollo de fármacos (Berman, *et. al.*, 2000). Luego, se crea GenBank en Los Alamos, Nuevo México, siendo esta una base de datos pública de secuencias de nucleótidos, bibliografía de apoyo y anotación biológica y a partir de 1992 es mantenida por el National Center for Biotechnology Information (NCBI), el cual forma parte del Instituto Nacional de la Salud (NIH, por sus siglas en inglés) (Benson, *et. al.*, 2015). GenBank es hoy en día una de las colecciones más completas de datos y anotaciones de secuencias nucleotídicas de una gran cantidad de organismos. El contenido incluye ADN, ARN mensajero (ARNm), ADN complementario (ADNc), marcadores de secuencia expresada (EST, por sus siglas en inglés) y datos crudos de secuencias realizadas masivamente (Xiong, 2006). Estos son solo dos ejemplos de las numerosas bases de datos biológicas que existen actualmente.

### **Análisis de secuencias**

El análisis de la secuencia de ADN es el descubrimiento de similitudes funcionales y estructurales y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas. Esto puede hacerse comparando las nuevas secuencias (desconocidas) con las bien estudiadas y anotadas (conocidas). Cabe destacar que este análisis incluye la alineación de secuencias, la búsqueda en la base de datos de secuencias, el descubrimiento de patrones, la reconstrucción de las relaciones evolutivas y la formación y comparación del genoma (Meneses, *et al.*, 2011).

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

La comparación de las secuencias del gen ADNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre organismos procariotas, de forma similar las regiones ITS y D1/D2/D3 permite hacer lo mismo en eucariotas. Esto ha traído una gran repercusión en la taxonomía microbiana, ya que ha dado lugar al sistema de clasificación actual que ha permitido la identificación rápida y precisa tanto de procariotas como de eucariotas. Las moléculas del ADNr 16S e ITS están presentes en todas las bacterias y en todos los eucariotas respectivamente, su análisis es por tanto, un instrumento de identificación universal, una de las características que las hace tan útil es que su estructura y función han permanecido sin mayores alteraciones durante un tiempo muy largo, de manera que cualquier cambio en la secuencia refleja sobre todo cambios aleatorios que ocurren de una forma suficientemente lenta, de modo que puede aportar información acerca de todos los procariotas a través de la escala evolutiva (Rodríguez, 2013; Rodicio y Mendoza, 2004).

### **Correlación filogenética**

La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas. Un análisis filogenético indica las relaciones evolutivas entre las especies, cuales descienden de ancestros comunes y cuáles son las distancias entre ellas. Los métodos filogenéticos reconstruyen árboles en los que las ramas y los nodos unen a los diferentes taxones, que pueden ser especies, individuos, genes, etc. Al recorrer las ramas desde los nodos terminales hacia el nodo original, recorreremos la historia evolutiva de ese gen u organismo (Acuña, 2015). Los árboles agrupan los organismos, de manera que todo lo que hay alrededor de un nodo es considerado un grupo monofilético, es decir, que todo el grupo se originan de un único ancestro común y por tanto pueden poseer rasgos comunes, cuando se presenta que un grupo excluye a algunos de sus descendientes se denomina parafilético (Baudalf, 2003).

Los árboles filogenéticos se pueden construir a partir de alineamientos múltiples de secuencias. En este caso se asume que cada posición en el alineamiento es homóloga, por lo tanto, construir un buen alineamiento es esencial para la resolución del árbol. La mayoría de los programas de alineamiento ofrecen una solución subóptima (la mejor posible utilizando pocos recursos del sistema), en consecuencia, resulta conveniente revisar los alineamientos antes de realizar los árboles. En general los problemas suelen acumularse en las regiones más variables en las que hay muchas sustituciones o gaps, en estos casos se podrían estar incluyendo posiciones que no son homólogas de modo que se estaría introduciendo una información no correcta en el análisis, por consiguiente, la revisión de los alineamientos se ha realizado con programas desarrollados para tal fin. Para la construcción de árboles filogenéticos a partir de métodos taxonómicos basados en secuencias, solamente una secuencia es requerida para identificar el organismo en términos de su tipo filogenético (Acuña, 2015).

## Desarrollo de un proceso de Producción de *Trichodermas*

### 5.3 Reproducción masiva de hongos *Trichodermas*

#### 5.3.1 Cultivo monospórico

El proceso de identificación de hongos no se basa únicamente en características morfológicas, sino también mediante métodos moleculares, donde el objetivo fundamental es que el cultivo a estudiar sea proveniente de una única espora. Los cultivos monospóricos pueden proporcionar datos adicionales para la identificación, y establecer las conexiones entre el estado teleomorfo y el anamorfo, debido a esto la identificación de los microorganismos debe incluir la comparación de ambos procesos tanto morfológicos como moleculares (Álvarez, 2011).

#### 5.3.2 Sustratos

Los sustratos empleados para la reproducción de hongos del genero *Trichoderma* en lo posible deben contener todos los elementos necesarios para una adecuada síntesis del material celular y para la producción de metabolitos cuando son requeridos.

##### 5.3.2.1 Arroz

El arroz es el material más rico en almidón, en torno al 70%. Su contenido en proteína es bajo (7.3%) pero es rico en lisina (4.1%). Su contenido en ceniza es muy escaso y su aporte en macrominerales prácticamente despreciable. Así mismo, su contenido en vitaminas es muy bajo. El arroz original es rico en aceite que a su vez es rico en vitamina E, este aceite tiene un alto contenido en ácido linoléico por lo que se enrancia muy fácilmente. De aquí que la fracción grasa del arroz se elimine y que el grano comercial contenga cantidades mínimas de grasa (<0.6%). El contenido en energía del grano de arroz es elevado, debido a su alto contenido en almidón y a la ausencia de factores antinutricionales(Chávez, 2006).

La estructura química del almidón es relativamente sencilla comparada con otros sustratos. Esencialmente el almidón está compuesto de dos polímeros relacionados en diferentes proporciones: amilosa (16-30%) y amilopectina (68-85%), la amilosa es un polímero de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4, principalmente en cadenas lineares. La amilopectina es un polímero de glucosa altamente ramificado incluyendo también enlaces  $\alpha$ -1,6 en los puntos de ramificación (Raimbault, 1998). De esta manera el hongo *Trichoderma* hidroliza el polímero de almidón mediante 77 enzimas como glucoamilasas,  $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, pululanazas e isoamilasas, obteniendo moléculas libres de glucosa, las cuales son fáciles de asimilar, permitiendo el crecimiento micelial y la producción de conidios, al mismo tiempo se producen ácidos orgánicos producto del desarrollo del microorganismo los cuales influyen en la disminución gradual del pH (Otalora, *et al.*, 2001).

##### 5.3.2.2 Maíz

El maíz (*Zea mays* L.) pertenece a las familias de las Poáceas (gramíneas) originaria y domesticado por los pueblos indígenas en el centro de México desde

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

hace uno 10,000 años e introducida a Europa en el siglo XVII, actualmente es el cereal con mayor volumen de producción a nivel mundial después del trigo, el maíz está compuesto principalmente de almidón 62.6%, proteína 9.2%, agua 12.5%, lípidos 3.8%, hidratos de carbono 8.4%, entre otros (Tovar, 2008). En Nicaragua, el maíz representa el 5% de la demanda de cereales, ya que es parte de los once productos de la canasta básica alimentaria, se cultiva por pequeños y medianos productores y está destinada más que todo para consumo familiar, comercio o consumo interno del país. Potencialmente se han identificado 4 zonas aptas para la producción de maíz: Rama/Bluefields (zona húmeda), Nueva Guinea-Santo Domingo y Chinandega (zona intermedia), Matagalpa-Jinotega-Rivas-Masaya y León (zona intermedia) y Estelí-Ocotal-Malpaisillo-Nagarote (zona seca) (González, 2018).

### 5.3.2.3 Olote de maíz

El olote de maíz se encuentra entre las fuentes de recursos no maderables con un alto contenido de xilanas, por lo que ha sido considerado de interés como fuente alternativa de diferentes compuestos químicos de interés comercial o industrial, entre otras fuentes de biomasa (Samanta, *et al.*, 2012). Es un tejido esponjoso y blanco que representa la médula donde se almacenan las reservas alimenticias del cereal. Está compuesto en base seca por celulosa, hemicelulosa y lignina, en el cual, según Saha & Bothast, 1999 el contenido de estas es 45, 35 y 15%, respectivamente. La hemicelulosa se compone mayoritariamente por xilano de olote (28-35 % base seca) uno de los heteroxilanos complejos que contiene residuos de xilosa con enlaces  $\beta$ -1,4 (Saha y Bothast, 1999). El xilano de olote de maíz se compone principalmente de xilosa (48-54 %), arabinosa (33-35 %), galactosa (5-11 %) y ácido glucurónico (3-6 %) (Doner & Hicks, 1997). Estas características le confieren al olote la posibilidad de ser empleado como sustrato.

Las xilanasas fúngicas son las más importantes desde el punto de vista industrial, debido a que sus actividades extracelulares son mucho mayores que aquellas provenientes de levaduras y bacterias. Especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* son ejemplos de microorganismos que pueden producir isoenzimas xilanolíticas. El *Penicillium* es el mayor saprófito en la naturaleza y numerosas especies son de particular valor para la humanidad, muchos de ellos constituyen una rica fuente de enzimas para la biodegradación del xilano (Knob & Cano, 2010). Se estima que por cada tonelada de maíz se obtienen 170 kg de olote (CIMMYT, 1995). El alto contenido de hemicelulasas del olote, del cual aproximadamente el 94% corresponde a xilanas, hace muy atractivo este residuo para el desarrollo de fertilizantes nitrogenados con acción prolongada o de lenta liberación (Mora, *et al.*, 2007).

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

El uso o aplicación química del olote ha estado muy restringido debido a la dificultad que existe para acceder a sus componentes (carácter recalcitrante) e incompleta caracterización química, así como la valoración de sus principales productos (lignina, celulosa y hemicelulosas). Estos aspectos han limitado su utilización y conducido a la quema del olote como recurso o al esparcimiento de sus residuos a la intemperie, generando un problema de contaminación ambiental. Entre los usos del olote que han sido reportados en la literatura se encuentran la aplicación como forraje para ganado, soporte para disminuir la erosión en la tierra y también como sustratos para la producción de la enzima xilanasa. Sin embargo, hay pocos reportes en la literatura sobre su potencial para la obtención de compuestos orgánicos u otros productos de uso industrial (Córdoba, *et al.*, 2013).

### 5.3.2.4 Copra de coco

La copra de coco es muy versátil para el cultivo de hongos *Trichodermas*, aporta aireación incluso cuando está saturado de agua y no se descompone con el tiempo volviéndose ácido como ocurre con la turba (Torrez, 2014). Una característica importante de este sustrato es que proporciona un ahorro del 30% en el consumo de agua y nutrientes, además este sustrato posee una buena capacidad de retención de agua y una porosidad adecuada. Este material puede ser reutilizado hasta por tres ciclos de producción, incluso, al desechar el material, se puede utilizar para regeneración de suelos (Campos, 2009).

La copra de coco se refiere a la parte del mesocarpio del fruto de coco. La copra está constituida por una capa externa o cubierta y una interna o xilema. El xilema posee una alta proporción de pectina, mientras en la cubierta tiene mayores concentraciones de lignina, esencialmente son materiales compuestos por celulosa, hemicelulosa y lignina, según Rincón, *et al.*, 2016 la composición de estas es de 36, 19 y 19%, respectivamente. Estas características la hacen resistente, especialmente a la tracción, además es muy elástica y de diámetro pequeño en corte transversal. Otra característica que permite usarlo por más de un ciclo de producción (hasta 3-5 años) es su resistencia a la degradación por microorganismo, además de ser muy liviana.

Es un sustrato de buena porosidad, es capaz de retener altos niveles de humedad sin llegar a saturarse, drenando los excesos y manteniendo una adecuada relación aire-agua (Rincón, *et al.*, 2016).

### 5.3.2.5 Melaza

La melaza es un subproducto del proceso de cristalización del jugo de caña de azúcar, una parte es empleada para la alimentación animal y otra se utiliza en la elaboración de alcohol carburante para la exportación, entre otros. Es un líquido denso y negrozco constituido por el residuo que permanece en las cubas después de la extracción de la mayor parte de los azúcares de la caña. Así mismo, la melaza es utilizada como sustrato debido a que es de alta pureza y por ende incrementa el

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

rendimiento y reduce el tiempo de reproducción (Lesniak, 1999). También, ha permanecido como una elección para ser la fuente de carbono en la producción de ciertos hongos. La melaza de caña ha sido aclamada por ser una materia prima de bajo costo y con grandes cantidades de azúcares en forma de sacarosa, glucosa y fructosa, el inconveniente es que contiene altas concentraciones de metales traza (calcio, magnesio, manganeso, hierro y zinc) (Beorlegui, 2003), por lo que la melaza de caña requiere un pre tratamiento para la reducción/remoción de los metales traza (Grewal & Kalra, 1995). La composición de la melaza de caña contiene alrededor de 20% agua, 62% azúcares, 10% de compuestos diversos que no contienen azúcar y 8% de sales inorgánicas que incluyen iones como Mn, Mg, Al, Fe y Zn en proporciones variables (Prescott & Dunn's, 1987).

### 5.3.3 Proceso fermentativo

Fermentación es el término utilizado para describir cualquier proceso para la obtención de un producto por medio del cultivo de un microorganismo. El producto puede ser la célula en sí, referida como producción de biomasa o un metabolito de un microorganismo. La producción de biomasa constituye con frecuencia el objetivo de numerosas fermentaciones; cuando se desea obtener esa producción es necesario hacerlo en las condiciones en las que el rendimiento energético sea el mejor, es decir, en la que haya una oxidación completa del sustrato por el oxígeno del aire y en las que toda la energía potencial del sustrato sea liberada y utilizada por la síntesis (Chávez, 2006).

#### 5.3.3.1 Fermentación sólida

La fermentación sólida puede ser definida como el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) en materiales sólidos húmedos en la ausencia de agua libre (Chahal, 1985). La habilidad de los microorganismos para crecer en un sustrato sólido es una función de sus requerimiento en cuanto a la actividad de agua, su capacidad de adherencia y penetración en el sustrato y su habilidad para asimilar mezclas de diferentes polisacáridos, debido a la naturaleza usualmente compleja de los mismos (Pérez, *et al.*, 2003), este tipo de fermentación involucra interacciones de la biomasa microbiana con un sustrato sólido humedecido, en este el microorganismo puede crecer entre los fragmentos del sustrato, por ejemplo, dentro de la matriz o sobre la superficie del sustrato (Rahardjo, 2001). Recientemente ha aumentado el interés en este tipo de fermentación debido a que pueden obtenerse mayores concentraciones de producto final (Pérez, *et al.*, 2003). Así mismo, este procedimiento provee una tecnología apropiada para el manejo de residuos agroindustriales siendo una tecnología eficaz para el desarrollo de varios bioprocesos y productos incluyendo la producción de enzimas industriales a gran escala (Nampoothiri, *et al.*, 2004).

Los microorganismos involucrados en la fermentación sólida, en su mayoría hongos filamentosos, sintetizan enzimas que degradan sustancias poliméricas en compuestos fácilmente asimilables. Estos mismos microorganismos tienen la

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

habilidad de convertir los compuestos degradados en enzimas y otro tipo de productos de utilidad. Los hongos filamentosos se caracterizan por ser organismos modulares, los cuales crecen por la interacción de módulos usualmente para producir un patrón de ramificación, la hifa tubular que emerge de la espóra se elonga en la punta y al mismo tiempo que crece la hifa se van formando nuevas ramificaciones; por estas y otras propiedades fisiológicas, enzimológicas y bioquímicas, los hongos filamentosos son los que se encuentran mejor adaptados para la fermentación sólida, el modo de crecimiento hifal les otorga a estos organismos el poder de penetrar en el sustrato sólido, debido a esto también le otorga una mayor ventaja sobre los organismos unicelulares durante la colonización del sustrato y el empleo de los nutrientes disponibles. Adicionalmente su habilidad para crecer a una baja actividad de agua y condiciones de alta presión osmótica (alta concentración de nutrientes) hace de los hongos organismos eficientes y competitivos para la bioconversión de sustratos sólidos (Pérez, *et al.*, 2003).

La eficiencia y productividad de la fermentación sólida son afectadas por varios factores. La característica más importante es el contenido de humedad del medio, lo cual diferencia este proceso de los cultivos líquidos. El agua es esencial para el crecimiento microbiano (Doelle, *et al.*, 1992). Dentro de los factores ambientales que afectan el crecimiento microbiano en la fermentación sólida se encuentran:

- Actividad de agua y contenido de humedad del sustrato: el contenido de humedad es un factor crítico en el proceso de fermentación sólida debido a que esta variable tiene influencia sobre el crecimiento, biosíntesis y secreción de diferentes metabolitos. Un bajo contenido de humedad causa reducción en la solubilidad de los nutrientes del sustrato, y alta tensión de agua. Por otro lado un alto nivel de humedad puede causar una reducción en la producción de enzimas. Generalmente el contenido de agua del sustrato oscila entre 30-75% (Pérez, *et al.*, 2003). La actividad de agua de los sustratos sólidos puede estar significativamente por debajo de 0.99, especialmente en las fermentaciones sólidas donde el agua libre permanece casi ausente. Esto tiende a favorecer a los hongos filamentosos, los cuales en su mayoría crecen bien con actividades de agua entre 0.93 y 0.98 (Doelle, *et al.*, 1992).
- Temperatura: el incremento en la temperatura en la fermentación sólida es una consecuencia de la actividad metabólica cuando el calor removido no es suficiente (Doelle, *et al.*, 1992). Este afecta de forma directa la germinación de esporas, así como el crecimiento. El nivel de temperatura alcanzado es una función del tipo de microorganismos, la porosidad, el diámetro de las partículas y la profundidad del sustrato (Pérez, *et al.*, 2003)
- pH: la medida y el control de esta variable en la fermentación sólida es difícil. Sin embargo, los sustratos empleados en este proceso usualmente tiene un efecto buffer debido a su compleja composición química.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

### 5.3.3.2 Fermentación bifásica

La fermentación bifásica está compuesta de dos fases que son líquida y sólida, el medio líquido empleado en la etapa de producción contiene una concentración adecuada de carbono y nitrógeno, los cuales son esenciales para el crecimiento de hongos. En la fermentación sólida, el sustrato sólido además de proveer un área superficial alta para la aireación, sirve también como soporte físico al hongo para la producción de estructuras germinativas o conidios aéreos y puede ser usado como fuente de nutrientes. Dentro de las ventajas de la fermentación bifásica se encuentran (Cruz, 2007):

- ❖ aumenta la competitividad del hongo de colonizar el sustrato y reducir la proporción de microorganismos contaminantes.
- ❖ La colonización y condición del sustrato sólido por el crecimiento activo del microorganismo durante la fermentación, es más rápida si se compara con una fermentación sólida en la cual no se emplea un medio líquido que favorezca dicho crecimiento.
- ❖ el uso de un líquido permite que el crecimiento del hongo en el sustrato sólido sea homogéneo.

### 5.3.4 Cosecha de esporas

La cosecha de esporas consiste en separar del sustrato las esporas del hongo y recolectarlas para su posterior formulación. La cosecha de esporas puede realizarse en equipos mecánicos como o en forma manual utilizando tamices más frotación, en que se cosechan pequeñas cantidades con fines de ensayos (Gómez, *et al.*, 2013).

### 5.3.5 Conservación del producto final

El producto final ya cosechado es empacado en bolsas de papel craft y sellado, este producto es afectado principalmente por la humedad, es por esta razón que se almacenan en dichas bolsas. Las bolsas deben almacenarse en lugares secos y a temperatura ambiente para que el hongo cosechado pueda mantener su viabilidad y también que sus características permanezcan inalterables (Gómez, *et al.*, 2013).

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

### 5.3.6 Aplicaciones de algunos *Trichodermas* en la agricultura

En la **Tabla 5.1** se presentan algunas de las aplicaciones de los hongos *Trichodermas*, la mayoría de las referencias consultadas son artículos científicos aplicados a la agricultura.

**Tabla 5. 1.** Aplicaciones biotecnológicas agrícola e industrial de algunos hongos *Trichodermas*.

<b>Microorganismos</b>	<b>Aplicaciones</b>	<b>Referencias</b>
<b>Trichoderma harzianum</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efecto de la aplicación de <i>Trichoderma harzianum</i> para el control de <i>Rhizoctonia solani</i> en la variedad arroz INTA N1 bajo inundación en Sébaco, Nicaragua.</li> <li>• Producción masiva de <i>Trichoderma harzianum</i> en diferentes sustratos orgánicos.</li> <li>• Detección y cuantificación de <i>Trichoderma harzianum</i>, y evaluación de su actividad biocontrol frente a fusariosis vascular del melón mediante la aplicación de herramientas moleculares.</li> <li>• Producción de enzimas de <i>Trichoderma harzianum</i> por fermentación de residuos lignocelulósicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Torres, (2005)</li> <li>• Michel, <i>et al.</i>, (2008)</li> <li>• López, (2011)</li> <li>• Gómez, <i>et al.</i>, (2019)</li> </ul>
<b>Trichoderma sp.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Trichoderma</i>: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial.</li> <li>• <i>Trichoderma</i>: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura.</li> <li>• Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> frente a hongos fitopatógenos.</li> <li>• <i>Trichoderma sp.</i> Y su función en el control de plagas en los cultivos.</li> <li>• Identificación Molecular de Cepas Nativas de <i>Trichoderma sp.</i> su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos.</li> <li>• Metabolitos secundarios en <i>Trichoderma sp.</i> y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Hernández, <i>et al.</i>, (2019)</li> <li>•Companioni, <i>et al.</i>, (2019)</li> <li>•Infante, <i>et al.</i>, (2009)</li> <li>•Martínez, <i>et al.</i>, (2013)</li> <li>•Guigón, <i>et al.</i>, (2010)</li> <li>•Mesa, <i>et al.</i>, (2019)</li> </ul>

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efecto de <i>Trichoderma</i> sp. y hongos fitopatógenos sobre el crecimiento vegetal y calidad del fruto de jitomate.</li> <li>• Biocontrol in vitro con <i>Trichoderma</i> sp. de <i>Fusarium subglutinans</i> (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y <i>F. oxysporum</i> Schlecht., Agentes Causales de la "Escoba de Bruja" del Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)</li> <li>• Efecto de <i>Trichoderma</i> sp., <i>Paecilomyces lilacinus</i> y la inyección de nematicida en el pseudotallo en el combate de <i>radopholus similis</i> y la producción de banano.</li> <li>• Efectos de la cepa nativa de <i>Trichoderma</i> sp. Y lixiviado de vermicompost bovino sobre el crecimiento foliar y contenido de clorofila en arroz (<i>oryza sativa</i> l.) en fase de semillero.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ruiz, <i>et al.</i>, (2018)</li> <li>• Michel, <i>et al.</i>, (2009)</li> <li>• Vargas, <i>et al.</i>, (2015)</li> <li>• Chávez, <i>et al.</i>, (2020)</li> </ul>
<b>Trichoderma longibrachiatum</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inoculación de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en algodón transgénico: Cambios en compuestos fenólicos y enzimas de estrés oxidativo.</li> <li>• Production of Chitinolytic Enzymes With <i>Trichoderma longibrachiatum</i> IMI 92027 in Solid Substrate Fermentation.</li> <li>• Cinética Enzimática del Bagazo de Caña para la Producción de Glucosa Utilizando la Enzima <i>Trichoderma longibrachiatum</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• González, <i>et al.</i>, (2017)</li> <li>• Kovacs, <i>et al.</i>, (2004)</li> <li>• Acevedo, <i>et al.</i>, (2014)</li> </ul>

## VI. METODOLOGIA

### 6.1 Muestreo y aislamiento de microorganismos

#### 6.1.1 Localización de estudio

Para este estudio se contaron con 18 muestras de suelo de diferentes áreas proveniente de los departamentos de Matagalpa y León. Su análisis se realizó en el Laboratorio de biotecnología del Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), ubicado en el Recinto Universitario Simón Bolívar, intersección Pista Juan Pablo II Avenida Universitaria, Managua, Nicaragua, entre las coordenadas 12° 07' 43" de latitud norte y 86° 16' 12" de longitud oeste. Para la extracción de ADN genómico de los microorganismos seleccionados se contrataron los servicios del Centro de biología molecular de la Universidad Centroamericana (UCA) ubicado entre las coordenadas 12° 07' 30" de latitud norte y 86° 16' 20" de longitud oeste, la secuenciación de ADN se realizó mediante la compañía MacroGen ubicada en Seoul, en la República de Corea del Sur y la parte experimental a escala de laboratorio se desarrolló en el laboratorio de biotecnología del PIENSA-UNI.

#### 6.1.2 Descripción de los sitios de muestreo

En el municipio de Terrabona, ubicado en el departamento de Matagalpa, jurisdicción de la Región Central del país entre las coordenadas 12° 43' 49" de latitud norte y 85° 57' 53" de longitud oeste, se realizó un reconocimiento de la zona específicamente en la comunidad de Cuajiniquil mediante la cooperativa campesina de producción Agropecuaria para determinar los sitios de muestreo, en el municipio se desarrollan actividades económicas como la ganadería y la agricultura donde se dan condiciones medioambientales favorables para el crecimiento de especies microbianas. Por otro lado, se recibieron 10 muestras de suelo provenientes del laboratorio de hongos entomopatógenos de la escuela de agroecología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN), ubicado en el departamento de León entre las coordenadas 12° 26' 13" de latitud norte y 86° 52' 45" de longitud oeste.

#### 6.1.3 Toma de muestras

Se deben de tomar en cuenta todas las condiciones desde la recolección de las muestras hasta la culminación del experimento, debido a que la temperatura, humedad y duración de almacenamiento de las muestras afecta la flora microbiana y también los procesos que en ella intervienen. La toma de muestras se realizó siguiendo el protocolo usado por Moya, *et al.*, 2014. Para las muestras de suelo se tomaron 5 submuestras sistemáticas en forma de X de cada una de las áreas definidas a profundidad de 20 cm aproximadamente, tomando como referencia cada extremo de la X y el centro. El peso aproximado de cada submuestra tomada fue de 60 g, obteniéndose así un peso total de la muestra de 300 g, posteriormente, las muestras fueron llevadas al laboratorio de biotecnología en bolsas de papel craft como se muestra en la **figura 6.1**, para su posterior análisis.



**Figura 6.1.** Muestras de suelo provenientes de Terrabona, Matagalpa y León (Fuente propia).

Se obtuvo un total de 18 muestras de suelo, la cual 8 de ellas son provenientes de Terrabona, Matagalpa y las otras 10 muestras provienen del Laboratorio de Hongos entomopatógenos de la Escuela de Agroecología de la UNAN-León.

#### 6.1.4 Preparación de medios de cultivos

La preparación de los medios de cultivo es una metodología de rutina usada en los laboratorios para el crecimiento de microorganismos deseados. De manera general, son ricos en proteínas y aminoácidos, suelen contener algún componente que favorezca el crecimiento del microorganismo que se desea estudiar, como vitaminas, sangre, suero, entre otros. Dicha preparación varía ampliamente dependiendo del tipo de microorganismo que se desea cultivar y de las especificaciones del fabricante. Según las especificaciones del fabricante para el Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y Agar Luria-Bertani (LB), se agregaron 39, 65 y 40 g, respectivamente en 1 L de agua destilada. Una vez preparado los medios de cultivo se colocaron en un Hot Plate CORNING Mod. PC-620D hasta llegar al punto de ebullición, luego se esterilizaron en autoclave LLAMATO Mod. SQ810C durante 15 minutos a 121°C y una presión de 103.5 kPa (15psi). Finalmente, se vertieron en placas Petri hasta lograr su solidificación a la temperatura del laboratorio (24 °C) (**figura 6.2**) (Solano, 2006).



**Figura 6.2.** Preparación de medios de cultivo. **A:** medio de cultivo PDA en su envase, **B:** calentamiento a 500°C y con agitación a 31.42 rad/s del medio de cultivo en el Hot Plate, **C:** Dispensación del medio de cultivo en tubos de ensayo para su posterior esterilización en el autoclave y **D:** Medio de cultivo solidificado en placas Petri (Fuente propia).

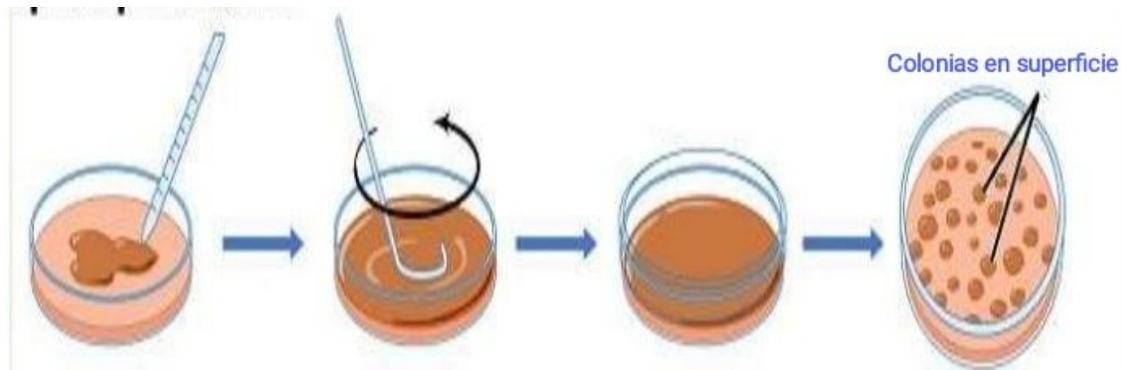
### 6.1.5 Inoculación de las muestras

Una vez obtenidas las 18 muestras de suelo se dividieron en 2 lotes de 9 muestras cada uno, posteriormente se inocularon en medio PDA y SDA aplicando técnicas de siembra masiva (Acurio y España, 2017). La siembra en los dos medios se realizó con el fin de obtener un mayor crecimiento de hongos filamentosos, entre ellos los hongos *Trichodermas* que son de nuestro interés.

#### 6.1.5.1 Siembra masiva en superficie

Se utilizó la técnica descrita por Acurio y España, 2017, en la cual se tomaron 5 g de suelo y fueron colocados en Beaker estériles con 50 mL de solución de cloruro de sodio al 1%, luego se agitaron suavemente con la ayuda del Shaker SCIOLOGEX SK-0330-Pro durante 15 minutos y posteriormente, con el fin de que las impurezas sedimentaran, se dejó reposar durante 10 minutos; finalmente se tomaron 100  $\mu$ l de cada muestra y se inoculó por duplicado en placas Petri con medio PDA y SDA (**figura 6.3**), las placas Petri inoculadas fueron colocadas en la cámara de flujo laminar TELSTAR Mod. AV-100 a una temperatura de 28°C durante un periodo de tiempo de 14 días, donde fueron analizadas diariamente con el fin de observar el crecimiento de hongos filamentosos que eran de interés.

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas



**Figura 6. 3.** Técnica de siembra masiva en superficie (Madigan, *et al.*, 2009).

### 6.1.6 Aislamiento microbiano

El aislamiento de los microorganismos se realizó en medios sólidos PDA para hongos filamentosos y LB para bacterias, aplicando las técnicas de siembra por estría para las bacterias y siembra por punción para hongos filamentosos.

#### 6.1.6.1 Selección y purificación de cepas microbianas

El resultado de la siembra masiva en superficie fueron cultivos mixtos, con los cuáles se procedió a realizar la selección, el aislamiento y la purificación de las colonias obtenidas de acuerdo a sus características macroscópicas y mediante la observación al microscopio verificando que se trataba de un cultivo axénico posterior a su aislamiento. El análisis del cultivo mixto se realizó durante 7 días en el caso de las bacterias y 14 días para los hongos filamentosos. Las técnicas empleadas para la purificación de las cepas obtenidas fueron, la siembra por estría para las colonias bacterianas (como parte de un plus de la presente investigación se aislaron cultivos bacterianos con el fin de ampliar la base de aislados del banco de microorganismos del laboratorio de Biotecnología del PIENSA) y la siembra por punción para los hongos filamentosos (Páramo, 2012).

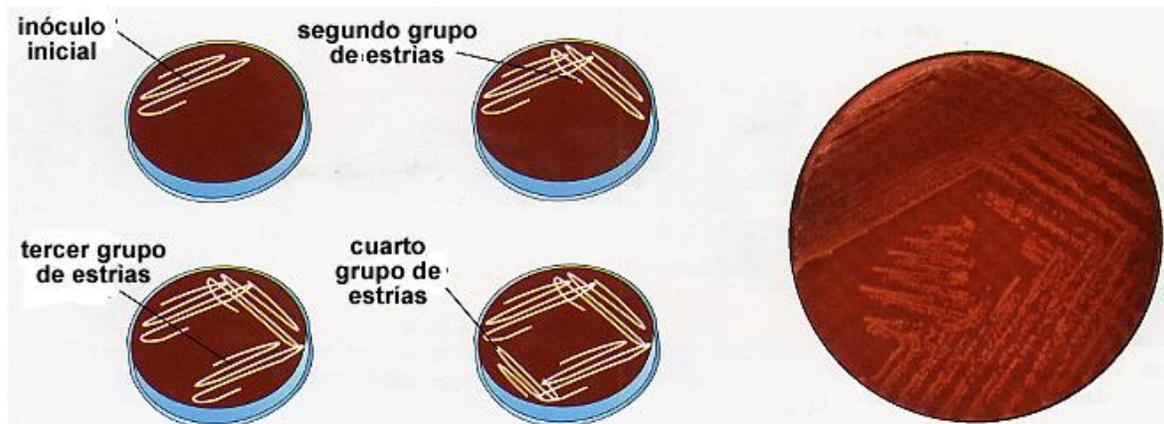
#### **Aislamiento y purificación de bacterias**

Después de 24 horas de inoculadas las placas Petri, se procedió a revisarlas con el fin de observar el crecimiento de bacterias y seleccionar las colonias mediante características morfológicas macroscópicas las que eran distintas para proceder a purificarlas.

El aislamiento y purificación de las bacterias se realizó en el medio de cultivo Agar Luria-Bertani utilizando la técnica de siembra por estría (**figura 6.4**), este procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar TELSTAR Mod. AV-100 en condiciones asépticas. Las placas petri se colocaron en la incubadora MEMMERT No. Serie: 377010 a 37°C durante 24 horas (Cuervo, 2010). Una vez transcurrido el tiempo (en algunos casos hasta más tiempo), las bacterias aisladas fueron sembradas en una nueva placa Petri, la cual se realizó transfiriendo las colonias de interés con ayuda del asa de siembra, y en la nueva placa se distribuyeron las

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

células con la técnica de estriado en agar, con el fin de obtener un cultivo axénico puro (Moreno y Albarracín, 2012).



**Figura 6. 4.** Técnica de siembra por estría aplicada para aislar las colonias bacterianas de los cultivos mixtos ( Madigan, *et al.*, 2009).

### Asilamiento y purificación de hongos

El cultivo mixto obtenido de la siembra masiva se observó durante 14 días para un crecimiento completo, las colonias de interés se seleccionaron de acuerdo a sus características macroscópicas y la purificación de las mismas se llevó a cabo en medio PDA mediante la técnica de la siembra por punción con un asa recta, este procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar TELSTAR Mod. AV-100 en condiciones asépticas. Las placas se incubaron a 28°C en un periodo de tiempo de 3-7 días. Las resiembras fueron necesarias hasta obtener un cultivo axénico (Solano, 2006).

#### 6.1.7 Identificación macro y microscópica de los microorganismos

La identificación de los microorganismos aislados en este trabajo, se realizaron mediante las vías morfológicas y moleculares, de tal forma que los microorganismos se identifican por género y especie de acuerdo a sus características macro y microscópicas y su análisis bioinformático. Las pruebas morfológicas macroscópicas para la identificación microbiana, se refieren primeramente a las características físicas de las colonias tanto de hongos como bacterias, ya sea en la forma, el color, la consistencia, etc.; mientras que las pruebas morfológicas microscópicas, se refieren a las características celulares del microorganismo en cuestión, ya sea tejido celular, esporas, etc., por medio de diversas técnicas microscópicas como: tinción de Gram, gota en fresco, entre otras (Moya, *et al.*, 2014).

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

### 6.1.8 Pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación macro y microscópica de los microorganismos

#### 6.1.8.1 Tinción de Gram en bacterias

Las bacterias previamente aisladas se sometieron a una tinción de Gram para la caracterización morfológica de ellas. Primeramente, se preparó el frotis que se llevó a cabo con el asa de siembra y esto se dispersó en una gota de agua destilada estéril en un portaobjetos. Luego se esparció la solución homogéneamente en un pequeño espacio del portaobjetos y se remarca con un marcador el lugar donde se encontraba la muestra distribuida. Se dejó secar hasta que no hubiese humedad en el portaobjetos y se comenzó con la tinción. Primeramente, se colocó el cristal violeta sobre la seña donde se encuentra la muestra y se dejó reposar por 1 minuto, luego se remueve con agua y se colocó el otro colorante que es el yodo-lugol por 1 minuto, seguido de este el alcohol-cetona por 20 segundos, y una vez se remueva el alcohol-cetona después de decolorar la muestra, se distribuyó el colorante de contraste safranina por 1 minuto. Luego de esto la muestra se dejó secar y una vez seco se observó en el microscopio OLYMPUS CH-2 con un objetivo de 100x para bacterias, utilizando aceite de inmersión para su mejor observación. Esto permitió caracterizar las colonias de las bacterias como puede ser su tamaño y forma, y también caracteriza específicamente en Gram Negativo y Gram Positivo según el color que mostraban bajo su observación morfológica (**figura 6.5**) (López, *et al.*, 2014). Esto se realizó como un plus de la presente investigación y con el objetivo de ampliar la base de aislados del banco del laboratorio de Biotecnología tanto con bacterias como con hongos para que puedan ser utilizadas en futuras investigaciones.

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

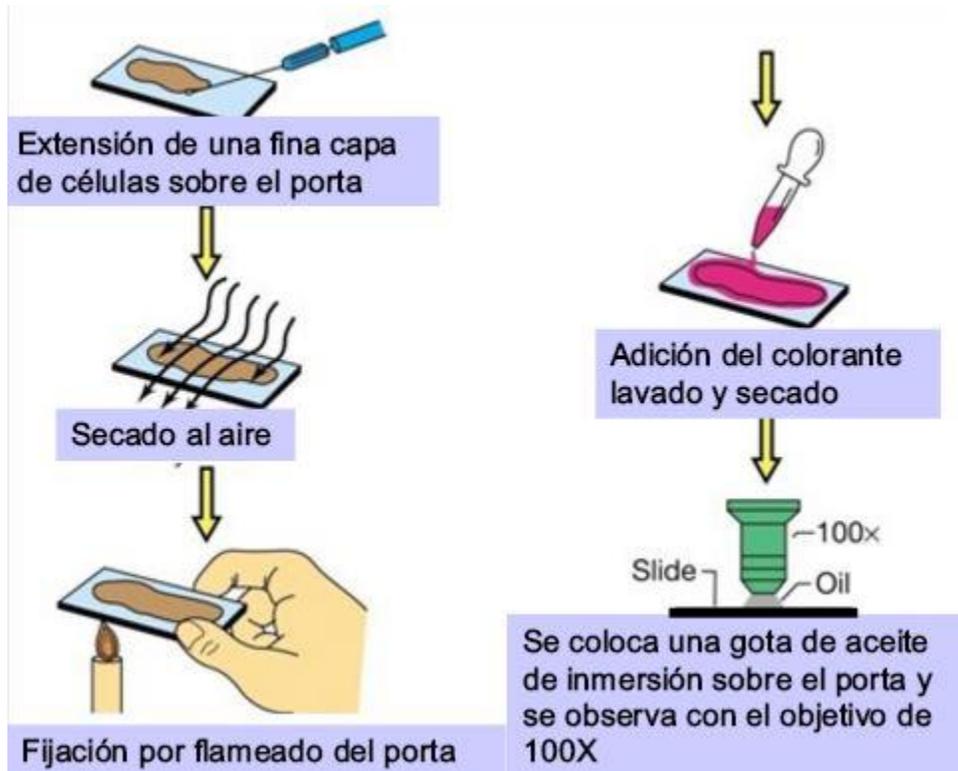
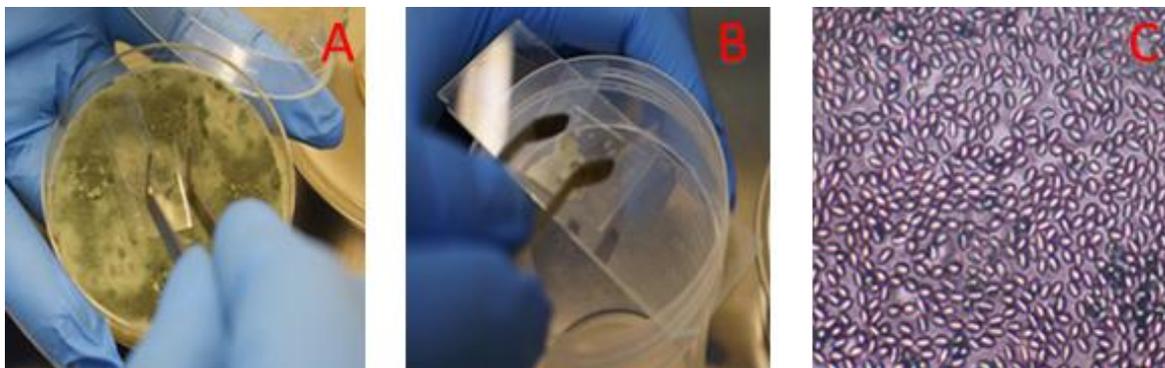


Figura 6. 5. Técnica de tinción de Gram para bacterias (Tortora, *et al.*, 2007).

### 6.1.8.2 Técnica de la cinta adhesiva para la observación de esporas en hongos filamentosos

Los hongos filamentosos se dejaron en crecimiento en placas Petri que contenían PDA en la cámara de flujo laminar entre 3 a 7 días, a una temperatura de 28°C, seguido de esto se realizó un montaje para la observación microscópica de estos, la cual consistió en tomar una muestra del hongo ya crecido en una porción pequeña de la cinta adhesiva y esta se colocó en un portaobjetos. Luego, se observó en un microscopio OLYMPUS BH-2 con objetivo de 50x para describir sus características morfológicas como lo son forma de las esporas, esporangio e hifas. Esta técnica permitió observar las estructuras fúngicas casi sin alteración (Figura 6.6) (Arias y Piñeros, 2008).



**Figura 6. 6.** Técnica de cinta adhesiva para la observación de esporas en los hongos filamentosos. **A:** Toma de esporas del hongo con la cinta adhesiva, **B:** Fijación de la cinta adhesiva sobre el portaobjeto y **C:** Observación de esporas en el microscopio OLYMPUS BH-2 con el objetivo de 50x (Fuente propia).

## 6.2 Identificación molecular

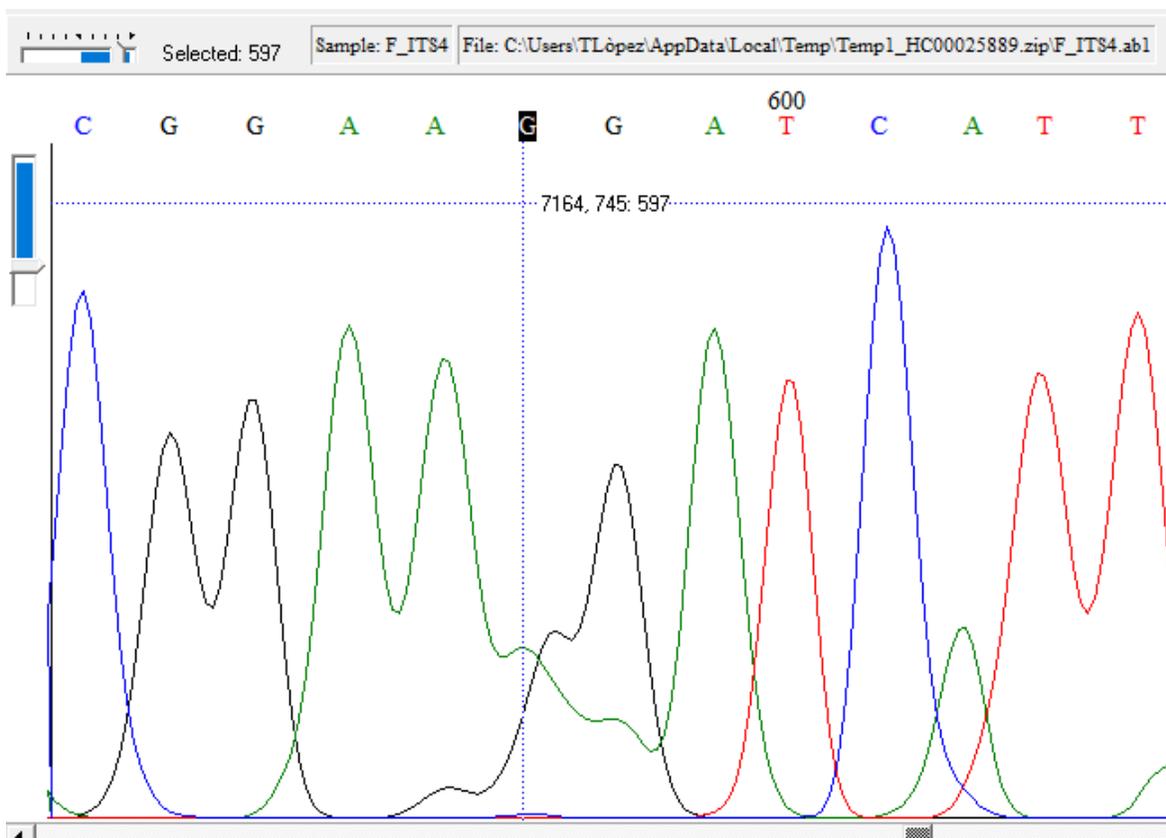
### 6.2.1 Extracción de ADN, PCR y secuenciación

La identificación de los microorganismos de forma molecular, se realizó mediante un estudio genómico, para lo cual se procedió a la extracción de ADN del microorganismo, mediante los servicios del Centro de biología molecular de la Universidad Centroamericana (UCA). Se le realizó el proceso de extracción de ADN específicamente a hongos previamente aislados, y que mediante sus características morfológicas, apuntan a ser posibles *Trichodermas*.

Para tal efecto se contó con los servicios del Centro de Biología molecular de la UCA. La amplificación por medio de la técnica de PCR y las reacciones de secuenciación, se desarrolló mediante el análisis de la región ITS (Internal Transcribed Space), la cual es específica para hongos filamentosos, con los primers ITS1 e ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' y 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Umaña, *et al.*, 2019; Ruiz, 2014; Flores y Roque, 2017). Los análisis antes mencionados fueron efectuados por la compañía Macrogen ubicada en Seoul, en la República de Corea del Sur, para luego seguir con los alineamientos de cada secuencia enviada.

### **Corrección de errores en los electroferogramas**

Las secuencias provenientes de Macrogen llevan errores en la lectura por parte del equipo ABI, por lo que fue necesario realizar correcciones manuales para dicha secuencia presente en el electroferograma. En la **figura 6.7** se observa un error en la lectura de la base nitrogenada 597 con respecto al color de la línea donde se intercepta, en este caso el color verde corresponde a la base nitrogenada Adenina que en el código genético se representa con la letra A y no una G como lo refleja la secuencia cruda en el electroferograma.



**Figura 6. 7.** Ventana del programa BioEdit v7.0.9 para la corrección manual de bases en la secuencia (Fuente propia).

Una vez editadas las secuencias, se guardaron en formato FASTA (**figura 6.8**). La calidad de las secuencias estaba definida mayormente por la calidad de la lectura de la secuencia cruda; por esto, se realizó una corrección minuciosa y precisa para el correcto análisis bioinformático, dónde se obtuvieron resultados confiables en términos de identidad del microorganismo. Para los hongos se obtuvieron alrededor de entre 400 y 600 pares de bases obteniendo la lectura correcta de estos en el GenBank (Castillo, *et al.*, 2015).

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

```
>F_ITS4.ab1 |
AGGGGGTTTTTCCTTACCTGATCCGAGGTCAACATTTTCAGAAGTTGGGTG
TTTAACGGCTGTGGACGCGCCGCGCTCCCGATGCGAGTGTGCAAACTAC
TGCGCAGGAGAGGCTGCGGCGAGACCGCCACTGTATTTTCGGAGACGGCCA
CCCGCTAAGGGAGGGCCGATCCCCAACGCCGACCCCCGGAGGGTTTCGA
GGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCG
CAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCGCAATTCACATT
ACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCC
GTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTCGAAACGCCACGAGAGGCGCCGAG
AAGGCTCAGATTATAAAAAAACCCGCGAGGGGGTATACAAAAGAGTTT
TGTTGGTCCCGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGG
GCAGAGATCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTACATTGGGTTTGG
GAGTTGTAACTCGGTAATGATCCCTCCGCAGTTCCCTACGGAAGGAT
CATTACCGAGTTTACAAC TCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAACTGT
TGCTTGGCGGGATTTCTGCTCCGGGTGCGTTCAAGCCCGGACCAGGGCGC
CGCCGGGGGACCAACCCACAAC TTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTT
TTTTTTTTATCCCGAACCTTTTGC GCGCCTCTCGTAGGGCTTTCTAAAC
AAAAACACAAATCTCTCCCCACGAGACGTCTGTGGTTCTGCCCTTCAA
```

**Figura 6. 8.** Archivo FASTA guardado luego de la corrección de errores (Fuente propia).

Las secuencias corregidas se compararon con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con secuencias que arrojaron ser similares y fueron reportadas al Gen Bank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), comparando cada secuencia parcial del gen ITS para hongos (**figura 6.9**).

Secuencias que producen alineamientos significativos		Descargar	Administrar columnas	mostrar				
<input checked="" type="checkbox"/> seleccionar todo 100 secuencias seleccionadas				100	<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Gráficos</a>	<a href="#">Árbol de resultados de distancia</a>	
	Descripción	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Adhesión	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Trichoderma harzianum aislar TV26 espaciador transcrito interno 1, secuencia parcial: 5.8S gen de ARN ribosómico y espaciador transcr</a>	1103	1103	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KP263553.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Trichoderma harzianum aislado TV22 18S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial: espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosó</a>	1103	1103	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KP263550.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Trichoderma virens aislar el gen de ARN ribosómico TV005 18S, secuencia parcial: espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómi</a>	1090	1090	100%	0.0	99.66%	<a href="#">KX092004.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Trichoderma harzianum aislado TH004 18S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial: espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribos</a>	1090	1090	100%	0.0	99.66%	<a href="#">KX092003.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Trichoderma sp. BAB-3269 18S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial: espaciador transcrito interno 1, gen de ARN ribosómico 5.8S</a>	1090	1090	100%	0.0	99.66%	<a href="#">KU504279.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Trichoderma virens cepa WZ-74 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parcial: espaciador transcrito interno 1, gen c</a>	1088	1088	99%	0.0	99.66%	<a href="#">MN856238.1</a>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Trichoderma virens cepa WZ-70 gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña, secuencia parcial: espaciador transcrito interno 1, gen c</a>	1088	1088	99%	0.0	99.66%	<a href="#">MN856234.1</a>	

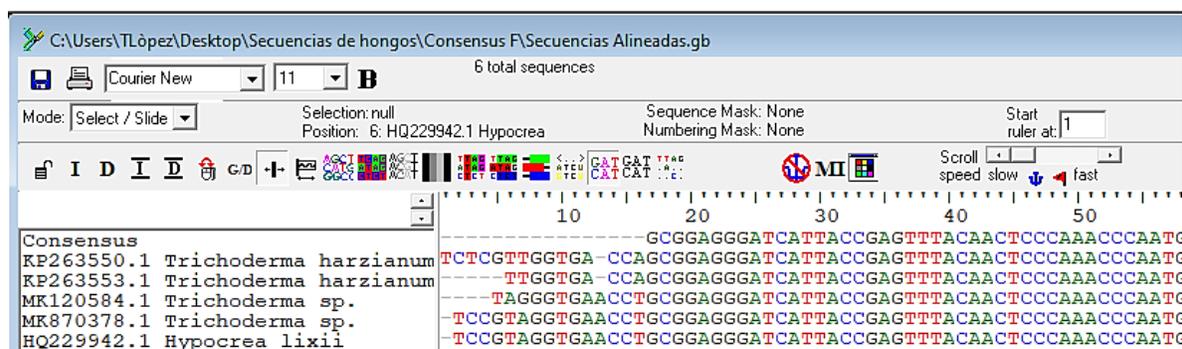
**Figura 6. 9.** Fragmento del listado de secuencias reportadas en Gen Bank del NCBI con las que muestra homología la secuencia problema (Fuente propia).

Al poner la secuencia trabajada y compararla con otras disponibles en el BLAST se proporciona diferente información que debe ser correctamente analizada. Primero, sale una sección donde se obtiene un gráfico que indica el nivel y el tamaño de los fragmentos alineados junto con un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad. Seguido de esto, aparece cada alineamiento de la secuencia problema frente a cada secuencia de otro

microorganismo, indicando el número y porcentaje de bases idénticas. La decisión de secuencias a tomar fue tomada en base al mayor porcentaje de identidad que estas arrojaban (Bou, *et al.*, 2011).

### Alineamiento de las secuencias corregidas

Las secuencias fueron alineadas en el programa BioEdit v.7.2.5, utilizando la aplicación ClustalW múltiple Alignment incluida en el menú accesory (**figura 6.10**). La actividad se basaba en hacer alineamiento múltiple de cada secuencia en estudio con cinco secuencias que se eligieron en el BLAST basados en el mayor porcentaje de identidad, frecuencia y máximo score (Rodríguez, 2013), tomando en cuenta las variaciones en las especies que arrojan del Gen Bank. Después de eso, se repiten los pasos de la comparación de las secuencias alineadas en el BLAST y se seleccionan otras cinco secuencias nuevas que se guardan en formato FASTA para finalmente realizar la construcción del árbol filogenético de los hongos en cuestión.



**Figura 6. 10.** Ventana del programa BioEdit v7.0.9, utilizando la aplicación Clustal W Multiple alignment for versión 1.4 para el alineamiento de la secuencia consensus (secuencia en estudio) con 5 secuencias procedentes del Gen Bank del NCBI (Fuente propia).

### 6.2.2 Construcción del árbol filogenético

La aplicación de MEGAX64 se utilizó para la construcción del árbol filogenético, usando el método del vecino más cercano. Se evaluó la confiabilidad haciendo bootstrapping de mil repeticiones, teniendo en cuenta que cada rama se debió repetir como mínimo en el 50% de las veces (Rodríguez, 2013). Se crearon archivos en formato FASTA que contenían las secuencias de estudio y también las cinco seleccionadas del Gen Bank mediante el programa BioEdit v7.0.9 para cada hongo. Se abrieron los archivos en el programa MEGAX64 y se utilizaron las herramientas Align by ClustalW y Phylogenetic analysis para alinear las secuencias y hacer el análisis filogenético, y finalmente se elaboró el árbol de relaciones evolutivas o filogenéticas con la herramienta Construct/Test Neighbor-Joining del mismo programa.

### 6.2.3 Conservación de los microorganismos

Los microorganismos se conservaron usando el método de transferencia periódica mensual que consiste en inocular las cepas a un medio de cultivo fresco en intervalos que aseguren la viabilidad de este (Hernández y Loaiza, 2014). La

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

transferencia se realizó en medio LB para bacterias y medio PDA para hongos filamentosos, utilizando las técnicas de siembra en estría y punción en dependencia del tipo de microorganismo. Los subcultivos se almacenaron en un refrigerador FRIGIDAIRE, Mod.FRT143DBLW a una temperatura de 10°C, en placas selladas con PARAFILM dentro de bolsas con cierre hermético para evitar el exceso de humedad.

### 6.3 Preparación de medios de cultivos (sustratos orgánicos) y reproducción masiva de hongos *Trichodermas*

Lo primero a tomar en cuenta al realizar la reproducción, son distintos medios de sustratos orgánicos que deben ser metódicamente tratados previo al proceso de reproducción en sí.

#### 6.3.1 Preparación y esterilización de Tween 80 al 0.1%

Primeramente se esterilizó el cuarto de siembra con luz UV durante 4 horas, posteriormente se preparó 1000 mL de Tween 80 al 0.1% siguiendo el protocolo descrito por Camero y Linares, 2013, luego se procedió a calentar la disolución en baño maría hasta que la misma alcanzó una temperatura constante de 68°C durante 3 horas (Gaitán y García, 1998) y se agitó cada 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se retiró la solución del baño maría (**figura 6.11**), se tapó con gasas estériles y se dejó reposar durante 24 horas en el cuarto de siembra con exposición directa de la luz UV sobre la misma, con el fin de completar la esterilización. Finalmente, la solución fue almacenada en refrigeración hasta su uso. En el **Anexo 1** se puede observar el cálculo realizado para la preparación del mismo.



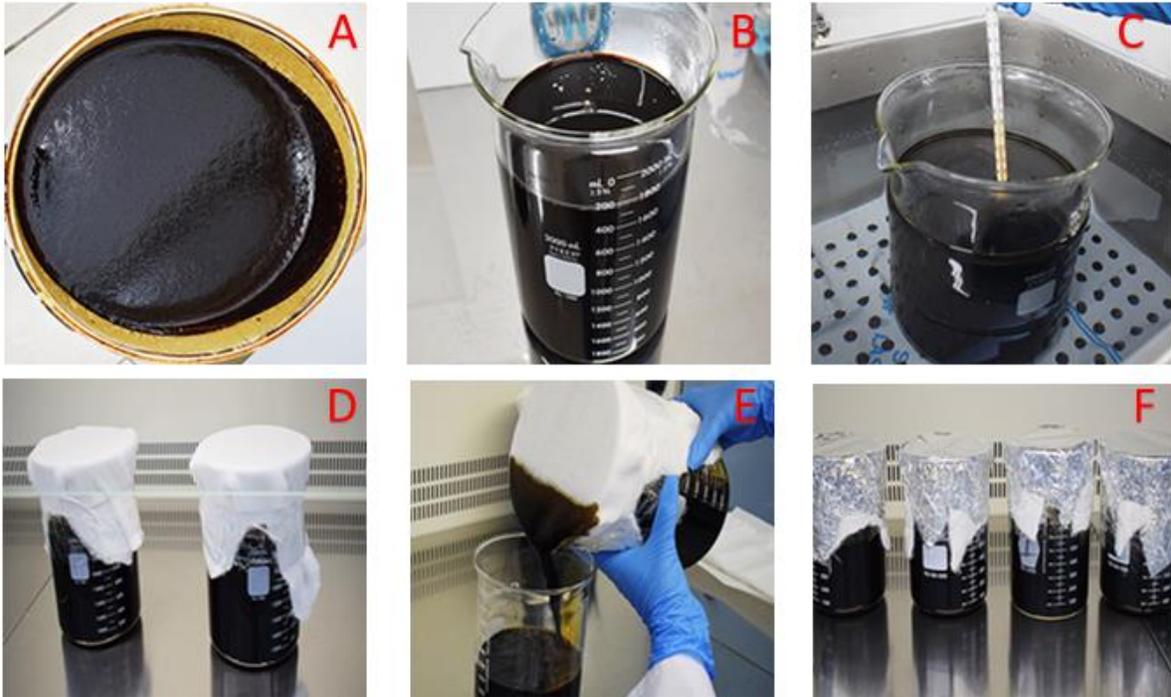
**Figura 6. 11.** Preparación y clarificación de TWEEN 80 al 0.1%. **A:** Toma de muestra de Tween 80, **B:** Dilución de TWEEN 80 con agua destilada y **C:** Clarificación de TWEEN 80 al 0.1% en Baño María a 68°C durante 3 horas (Fuente propia).

#### 6.3.2 Clarificación de mieles (melaza)

Se preparó melaza al 5%, con un contenido de azúcares reductores del 3.73% (**Ver anexo 2**) y para su clarificación se siguió el mismo procedimiento que con la esterilización del Tween 80 (sección 6.3.1). Antes de almacenar la solución, se separó por decantación el líquido sobrenadante (solución azucarada de los componentes de la melaza) del precipitado (lodos provenientes de la melaza). El

## Desarrollo de un proceso de Producción de *Trichodermas*

líquido sobrenadante se depositó en un beaker, se tapó con gasa y papel aluminio (Gaitán y García, 1998), posteriormente se esterilizó en autoclave durante 15 min a 103.5 kPa (15psi) y una temperatura de 121°C envasado en Erlenmeyers de 500mL. Finalmente, se dejó enfriar y se almacenó en refrigeración hasta su uso (**Figura 6.12**).



**Figura 6. 12.** Clarificación de melaza. **A:** Melaza proveniente de un comercio expendedor ubicado en Nandaime, Granada, **B:** Solución de melaza al 5%, **C:** Clarificación de melaza en el Baño María a 68°C durante 3 horas, **D.** Melaza en reposo durante 24 horas, **E:** separación por decantación de la solución azucarada y de los lodos de la melaza y **F:** almacenamiento de la melaza después de ser esterilizada en la autoclave (Fuente propia).

### 6.3.3 Cultivo monospórico

#### 6.3.3.1 Primera siembra de hongos *Trichodermas*

En esta etapa se realiza la siembra de los hongos *Trichodermas* identificados en placas PDA, con el fin de obtener cultivos frescos con un desarrollo óptimo de crecimiento. El periodo de crecimiento es de 48 horas.

#### 6.3.3.2 Segunda siembra de hongos *Trichodermas*

Se tomaron los hongos sembrados descritos en la sección anterior (6.3.3.1.) y se le agregaron 3 mL de Tween 80 al 0.1% esterilizado removiendo con suavidad las esporas de los hongos con ayuda del asa digralsky. Posteriormente con una micropipeta se tomó la cantidad de 1 mL de la solución de la placa y se depositó en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua estéril. La dilución obtenida es  $10^0$ ; este procedimiento se repitió hasta obtener la dilución  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , finalmente se tomaron 0.1 mL de cada una de las diluciones y se sembraron en placas PDA con

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

la ayuda del asa digralsky (French y Hebert, 1980). Este procedimiento se realizó con el fin de obtener una sola espora bien separada de las demás y también garantizando la siembra por duplicado, previniendo cualquier tipo de contaminación.

### 6.3.3.3 Obtención del cultivo monospórico y observación de crecimiento radial

Cuando se observó la espora de la segunda siembra descrita en el acápite anterior (6.3.3.2) se marcó la placa con un marcador y con la ayuda de un bisturí se cortó suavemente el medio con la marca, luego el corte de medio obtenido se sembró en el borde de una nueva placa petri con medio PDA con el fin de observar el crecimiento radial del hongo. Las placas que contenían el corte de medio con una sola espora se dejaron creciendo en la cámara de flujo laminar TELSTAR Mod. AV-100 y cada 12 o 18 horas se realizaban mediciones del crecimiento del hongo con ayuda de una regla y se marcaba la placa con líneas punteadas el crecimiento del hongo. Este procedimiento se realizó hasta que la placa se llenara totalmente de la cepa en cuestión. Una vez obtenidas las placas llenas, se procedió a realizar varios cortes en forma de cuadros que contenían crecimiento abundante de la espora germinada y se sembraron 3 cuadritos en una nueva placa con medio PDA, esto se realizó con el fin de obtener una placa totalmente llena y esporulada para su posterior inoculación en la reproducción masiva (Gómez, *et al.*, 2013).

### 6.3.4 Preparación de antibiótico

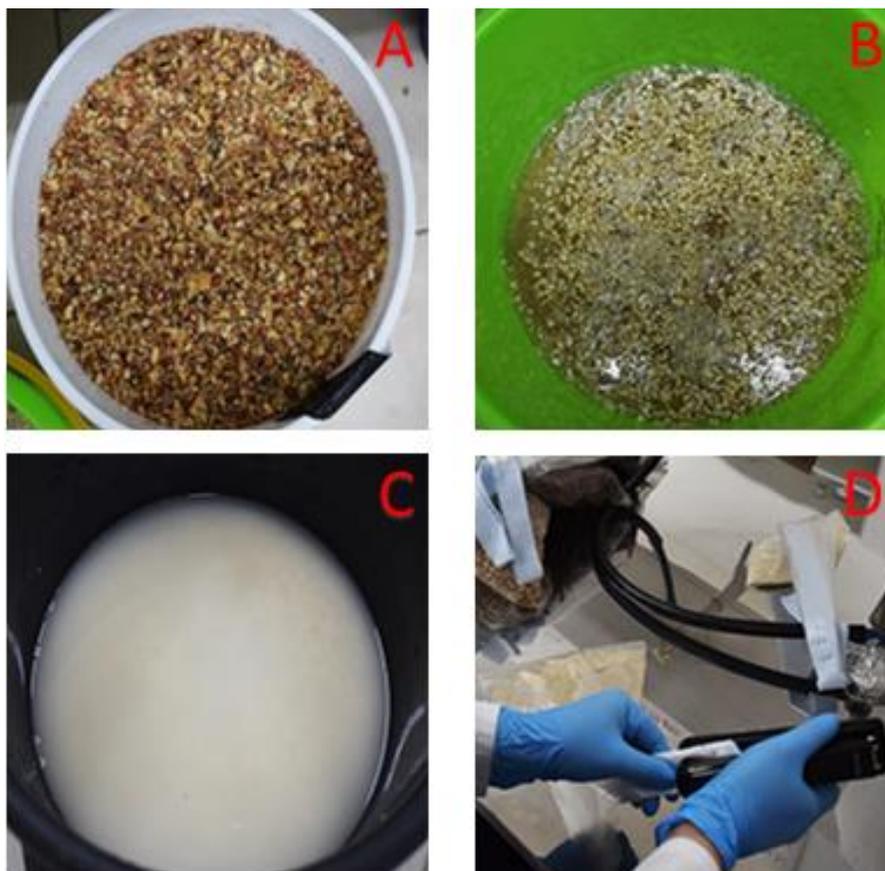
El objetivo principal del uso de antibióticos es inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos (bacterias), destruyendo o impidiendo su desarrollo y reproducción. Los antibióticos no afectan al organismo productor, y le ofrecen una ventaja desde el punto de vista de la supervivencia ya que le permite colonizar ambientes con más eficacia y sin la presencia de organismos competidores. Para la preparación del antibiótico se disolvió 1 capsula de amoxicilina MK de 500 mg en 1000 mL de agua estéril (Gómez y Mendoza, 2004).

### 6.3.5 Preparación y esterilización de sustratos orgánicos

Este procedimiento se realizó siguiendo la metodología descrita por Michel, *et al.*, 2008, tomándose en cuenta que cada uno de los sustratos se manipula de manera distinta, los sustratos utilizados fueron arroz como testigo, maíz triturado, olote de maíz triturado y copra de coco triturada, de la cual se pesaron 100 gramos de cada uno para ambas variantes (sin y con melaza). Para la variante sin melaza el sustrato pesado se dejó en remojo durante 15 minutos y posteriormente, se secó encima de papel craft cambiándolo periódicamente por un lapso de 5 horas. Para la variante con melaza el tiempo de remojo fue de 45 minutos y el proceso de secado fue de 12 horas. Al concluir la etapa de secado, se procedió a empacar los sustratos en bolsas plásticas, éstas fueron selladas con cintas de tela de algodón, para permitir aireación en el interior de la misma. Las bolsas debidamente selladas fueron sometidas a autoclave LLAMATO Mod. SQ810C por 15 minutos a 121°C y 103.5 kPa (15psi), cuando salieron de ésta se dejaron secar a temperatura ambiente

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

durante 13 horas aproximadamente, donde posteriormente fueron inoculadas con los hongos (**Figura 6.13**).



**Figura 6. 13.** Preparación de sustratos sólidos. **A:** olote de maíz triturado en remojo durante 45 minutos, **B:** Maíz triturado en remojo durante 45 minutos, **C:** Arroz en remojo durante 45 minutos y **D:** Sellado con grapas de las bolsas con los sustratos y las cintas de lanilla (Fuente propia).

### 6.3.6 Inoculación de los diferentes sustratos para reproducción de las cepas

Para llevar a cabo la inoculación se toma en cuenta la diferenciación de añadirle melaza al 5% a una variante y a otra no. Cabe mencionar que las esporas que fueron inoculadas en las bolsas se observaron al microscopio con anticipación por medio de la técnica de gota en fresco en un portaobjeto, para asegurarse de la efectividad del crecimiento de las cepas en los sustratos, ya que tuvieron el tiempo óptimo para reproducción en placa petri (Bader, *et al.*, 2020).

#### 6.3.6.1 Sustratos orgánicos de variante sin melaza

Para esta variante, se realizó el procedimiento descrito anteriormente con los sustratos (acápite 6.3.5). Una vez se tenían las bolsas autoclavadas y secas, se procedió a tomar una placa de reproducción masiva de la cepa en cuestión proveniente del acápite 6.3.3.3 y se le agregó Tween 80 al 0.1% más antibiótico, luego con ayuda del asa digralsky con un ángulo de inclinación de 45° se realizó en arrastre de esporas suavemente para obtener una suspensión concentra, donde

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

posteriormente fueron inoculadas en las bolsas que contenían los sustratos orgánicos y se dejó crecer durante 21 días (Michel, *et al.*, 2008).

### 6.3.6.2 Sustratos orgánicos de variante con melaza

En esta variante, se tomó en cuenta la humedad que podían tener las bolsas autoclavadas, por lo que se les estaba agregando más líquido que en la variante sin melaza y esto podía desfavorecer el crecimiento de los hongos. Cada sustrato orgánico utilizado en el presente trabajo absorbía diferente cantidad de humedad por lo que el rango de melaza empleada en cada bolsa era de 5-40 mL, cabe mencionar que la inoculación tanto de la melaza y del hongo se llevan a cabo el mismo día y en el mismo momento. Una vez se terminaron de inocular todas las bolsas, se dejaron en crecimiento durante 14 días (Mas, *et al.*, 2019).

### 6.3.7 Cosecha de esporas

Finalmente, al tener el hongo completamente desarrollado en las bolsas, se procedió a cosechar cada una de las bolsas que contenían las diferentes cepas de *Trichodermas*, para así tomar en cuenta el valor de esporas por gramo de relleno que se obtuvieron en todo el proceso de reproducción masiva. Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó una mezcla que consiste en fécula de maíz con gelatina simple, con el fin de que las esporas se separen del sustrato y absorban la humedad, de tal forma que se obtenga un polvillo mayormente de la cepa *Trichoderma* sin tanto rastro del sustrato utilizado (**Ver figura 6.14**).



**Figura 6. 14.** Cosecha de esporas de los hongos. **A:** Separación del hongo del sustrato (Cosecha de esporas) y **B:** Obtención de las esporas de los hongos (Fuente propia).

### 6.3.8 Cuantificación de esporas

El conteo de esporas fue realizado en la cámara de Neubauer MARIENFELD Modelo doble, siguiendo el procedimiento descrito por Gómez, *et al.*, 2013. Una vez cosechada todas las bolsas que contenían las cepas en los diferentes sustratos orgánicos, se pesaron 500 mg de cada muestra, se disolvieron en 10 mL de agua estéril y se agitó con un vortex SCIOLOGEX Mod. MX-S, de esta manera se obtuvo una solución madre, posteriormente se procedió a realizar diluciones seriadas con el fin de disminuir la concentración de esporas, luego se tomó una muestra de 10

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

$\mu\text{L}$  de la última dilución y se colocó en la cámara de Neubauer MARIENFELD Modelo doble. Finalmente, se colocó la cámara de Neubauer MARIENFELD Modelo doble en el microscopio y se contaron las esporas, tomando en cuenta todas las esporas que se encuentran dentro del cuadrado y las que se encuentran en las líneas de borde superior e izquierda, las esporas que se encuentran en las líneas de borde inferior y derecha no se toman en cuenta (**Ver figura 6.16**).

El modelo matemático utilizado para la cuantificación de esporas es el siguiente:

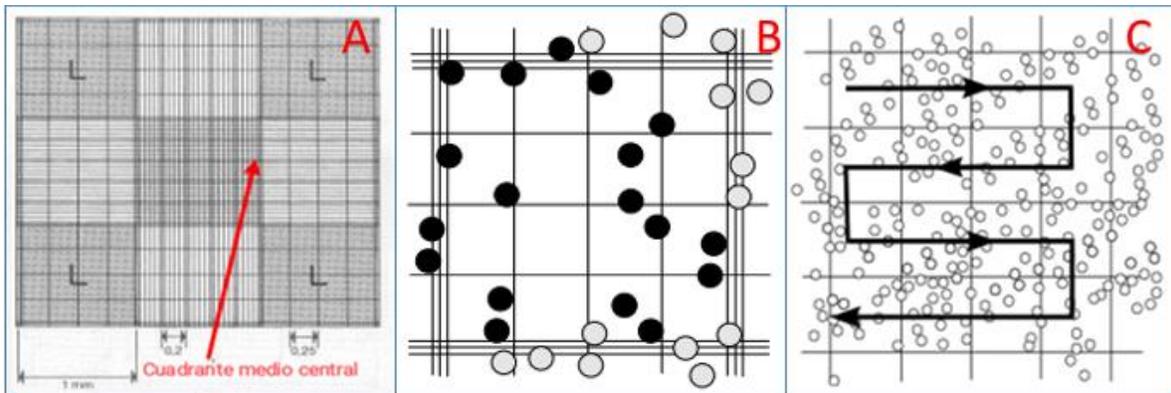
$$\frac{\text{Esporas}}{\text{gramo}} = 10^4 * \left(\frac{\bar{X}}{4}\right) * \left(\frac{V \text{ (mL)}}{Y \text{ (g)}}\right)$$

Donde:

$\bar{X}$  = Media de las esporas contadas del cuadrante medio central.

$V$  = Volumen empleado para obtener la solución madre.

$Y$  = Peso de la muestra.



**Figura 6. 155.** Vistas al microscopio de la Cámara de Neubauer. **A:** En el cuadrante medio central es donde se realiza el conteo de esporas, las áreas sombreadas con la letra L no se toman en cuenta, **B:** Conteo de esporas en uno de los cuadritos que están dentro del cuadrante medio central, los círculos negros son los que se toman en cuenta (parte superior e izquierda) y **C:** Técnica de conteo de las esporas (Gómez, *et al.*, 2013).

### VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hongos del género *Trichodermas* se distinguen por su morfología, alrededor de 30 especies distintas han sido descritas. Sin embargo, el uso de la biotecnología vegetal mediante la introducción de técnicas moleculares en micología evolutiva en los últimos años ha permitido revelar la existencia de más de 100 especies distintas (Druzhinina, *et al.*, 2006; Torres, *et al.*, 2015).

El género *Trichoderma* en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro los cuales presentan un rápido desarrollo en medios de cultivo sintéticos. Posee la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales. Estas estructuras toleran condiciones ambientales adversas y son de gran importancia para la supervivencia del género en el suelo bajo condiciones desfavorables (Harman, 2001).

La producción sostenible de alimentos sin afectar el ambiente es un reto para la sociedad actual que impone transformar los sistemas convencionales de explotación agraria en agroecológicos en las formas productivas. En este sentido, la utilización de microorganismos para el control de plagas y enfermedades, constituye una alternativa viable para lograr aumentos significativos en los rendimientos, calidad de los cultivos y reducir el impacto negativo de los agroquímicos en el ambiente. *Trichoderma* se considera uno de los antagonistas de hongos fitopatógenos más utilizado en la agricultura moderna (Companioni, *et al.*, 2019).

El presente trabajo se orientó específicamente a aislar, identificar y reproducir masivamente hongos del género *Trichoderma* para ser aplicados posteriormente a la agricultura. El seguimiento de los objetivos propuestos para esta investigación en correspondencia con la metodología detallada con anterioridad, permitió arribar a los siguientes resultados.

#### 7.1 Muestreo y aislamiento

##### 7.1.1 Toma de muestras

Los muestreos se efectuaron el 27 de junio del 2016 en León y el 21 de noviembre del 2019 en Terrabona, Matagalpa. Del muestreo realizado en Terrabona, Matagalpa, se obtuvieron 8 muestras de suelo. Como resultado se recolectaron un total de 18 muestras de suelo, las cuales se detallan a continuación en la **Tabla 7.1**.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Tabla 7. 1.** Resumen de las muestras de suelo provenientes de Terrabona, Matagalpa y León con fecha y área de muestreo (Fuente propia).

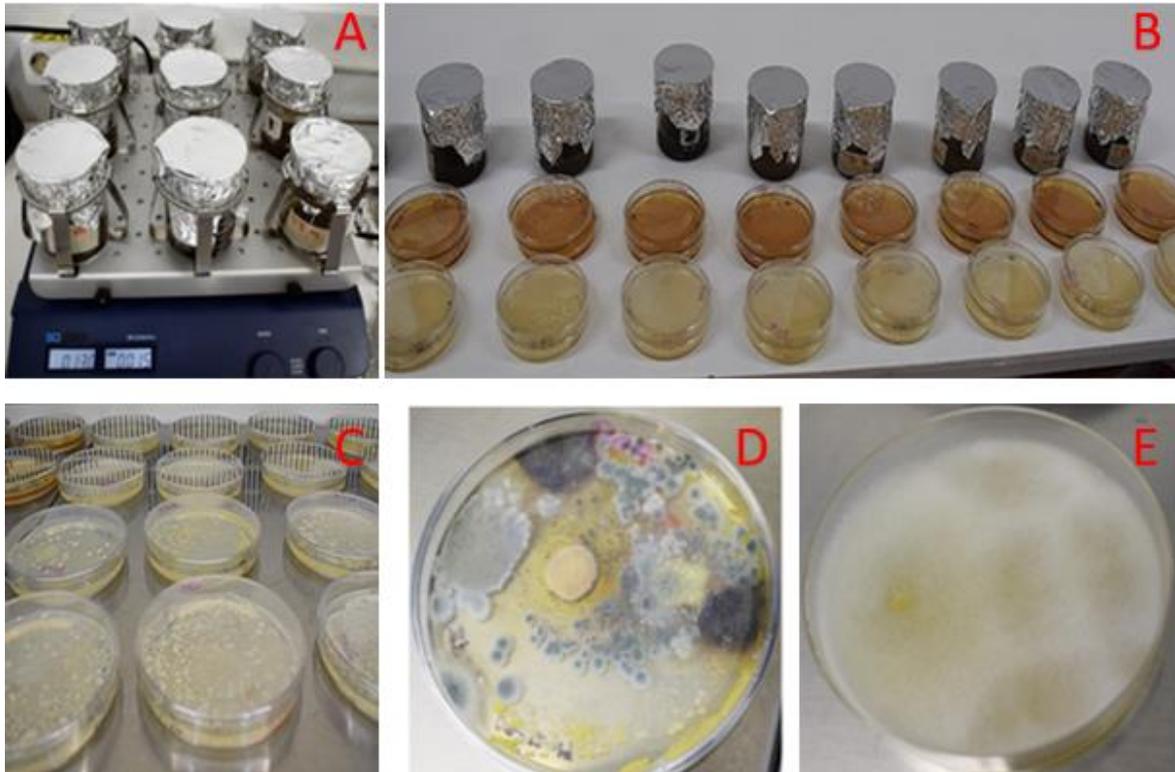
<b>Muestra</b>	<b>Fecha de muestreo</b>	<b>Área de muestreo</b>	<b>Ubicación de muestreo</b>
1	21/11/2019	Cultivo de tomate (área infectada)	Terrabona, Matagalpa
2	21/11/2019	Cultivo de pipián	Terrabona, Matagalpa
3	21/11/2019	Cultivo tomate	Terrabona, Matagalpa
4	21/11/2019	Cultivo tomate	Terrabona, Matagalpa
5	21/11/2019	Cultivo pepino	Terrabona, Matagalpa
6	21/11/2019	Cultivo de tomate	Terrabona, Matagalpa
7	21/11/2019	Cultivo de tomate	Terrabona, Matagalpa
8	21/11/2019	Área de ganado	Terrabona, Matagalpa
9	27/06/2016	Bosque	Finca Santa Cecilia, León
10	27/06/2016	Caña	Finca Santa Cecilia, León
11	27/06/2016	Maíz	Finca Santa Anita vijil, León
12	27/06/2016	Bosque	León Finca San José de los Marios, León
13	27/06/2016	Bosque	Finca Toro Blanco, León
14	27/06/2016	Bosque Teca	Finca Llanitos de San Luis, León
15	27/06/2016	Bosque Roble	Finca Llanitos de San Luis, León
16	27/06/2016	Bosque Eucalipto	León
17	27/06/2016	Bosque Bambú	Finca Los Ángeles, León
18	04/07/2016	Caña	Finca Aguas Calientes, León

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

### 7.1.2 Inoculación de las muestras

El suelo representa una mezcla compleja de fracciones orgánicas e inorgánicas con agua y organismos vivos. Las fracciones orgánicas se componen de material de plantas en diferentes fases de descomposición, raíces vivas, exudados, microorganismos, pequeños invertebrados y contenidos intestinales. Por esta razón, el suelo alberga una parte considerable de la biodiversidad total de hongos, y no existe ninguna estimación confiable del número de especies de hongos del suelo (Hawksworth, 1991; Hawksworth & Rossman, 1997).

Una vez obtenidas las muestras de suelo en el laboratorio fueron inoculadas a como se describió en la metodología (sección 6.1.5), obteniéndose cultivos mixtos donde las colonias de microorganismos surgieron desde las 24 horas después de inoculadas, en el caso de las bacterias y hasta 14 días para hongos filamentosos (Páramo, 2012). De estos cultivos mixtos, se aislaron varios cultivos axénicos de interés para este trabajo. En la **Figura 7.1** se observa los resultados obtenidos a partir de la inoculación de las muestras.



**Figura 7. 1.** Inoculación de muestras de suelo. **A:** Agitación de las muestras de suelo a 130 rpm durante 15 minutos, **B:** Siembra de muestras de suelo en placa Petri con medios PDA y SDA, **C:** Crecimiento bacteriano en placas Petri a las 24 horas después de inoculadas las muestras, **D:** Obtención de Cultivo Mixto a los 4 días después de inoculadas las muestras en las placas Petri y **E:** Obtención del cultivo axénico a partir del cultivo mixto (Fuente propia).

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

### 7.1.3 Aislamiento y purificación de microorganismos

Aplicando las técnicas de siembra por estría y por punción de microorganismos, se logró recolectar un total de 36 microorganismos puros aislados, entre ellos 7 bacterias y 29 hongos filamentosos. Dentro de los hongos filamentosos se encontraron 6 posibles hongos del género *Trichoderma*, los cuales se detallan a continuación en la **Tabla 7.2** (aislados de Terrabona, Matagalpa) y **7.3** (aislados de León).

Estas tablas (**Tabla 7.2 y 7.3**) arrojan resultados de que solo en las muestras de Terrabona, Matagalpa se encontraban hongos filamentosos con características similares a las de los *Trichodermas*. En el **Anexo 3** se representa la descripción del código de aislamiento de los microorganismos y en el **Anexo 4 y 5** se enlista la codificación de cada cultivo puro aislado en Terrabona, Matagalpa y en León, respectivamente. Por otro lado, las muestras tomadas en el departamento de León, no arrojó ningún cultivo axénico parecido a como se describen los *Trichodermas* macroscópicamente, encontrándose en su mayoría hongos del género *Fusarium*, este hongo es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica y que a la vez tiene la capacidad de atacar la planta cuando esta sufre algún tipo de desbalance (Michielse y Rep, 2009). Tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo, debido a sus estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, lo que vuelve inefectiva la rotación de cultivos a corto plazo (Lacy, *et al.*, 1996, Daugovish, *et al.*, 2008). Las muestras procedente de Terrabona, Matagalpa presentaban las condiciones necesarias para el crecimiento de hongos del género *Trichoderma* y de otros hongos en cuestión, debido a que estas muestras fueron analizadas inmediatamente después de realizado el muestreo, lo que permitió el aprovechamiento de todos los nutrientes de las mismas encontrándose una gran variedad de microorganismos, mientras que las muestras provenientes de León llevaban mucho tiempo almacenadas en el laboratorio de hongos entomopatógenos de la escuela de agroecología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN), debido a esto las muestras perdieron condiciones de crecimiento (humedad, materia orgánica, etc.), es por esta razón que no se encontraron microorganismos de interés (hongos *Trichodermas*) para esta investigación.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Tabla 7. 2.** Consolidado de los cultivos axénicos bacterianos y fúngicos aislados procedente de las muestras de Terrabona, Matagalpa y su respectiva codificación (Fuente propia).

<b>Procedencia de la muestra</b>	<b>Código de la muestra</b>	<b>Bacterias Aisladas</b>	<b>Otros Hongos Aislados</b>	<b>Posibles Trichodermas</b>
Cultivo de tomate	TG-I			1
Cultivo de pipián	TG-II			1
Terrabona	TG-III	1		
Cultivo tomate	TG-IV	1		
Cultivo pepino	TG-V		3	1
Cultivo de tomate	TG-VI			
Cultivo de tomate	TG-VII	4	2	3
Área de ganado	TG-VIII		2	
<b>TOTAL</b>			<b>19</b>	

**Tabla 7. 3.** Consolidado de los cultivos axénicos bacterianos y fúngicos aislados procedente de las muestras de León y su respectiva codificación (Fuente propia).

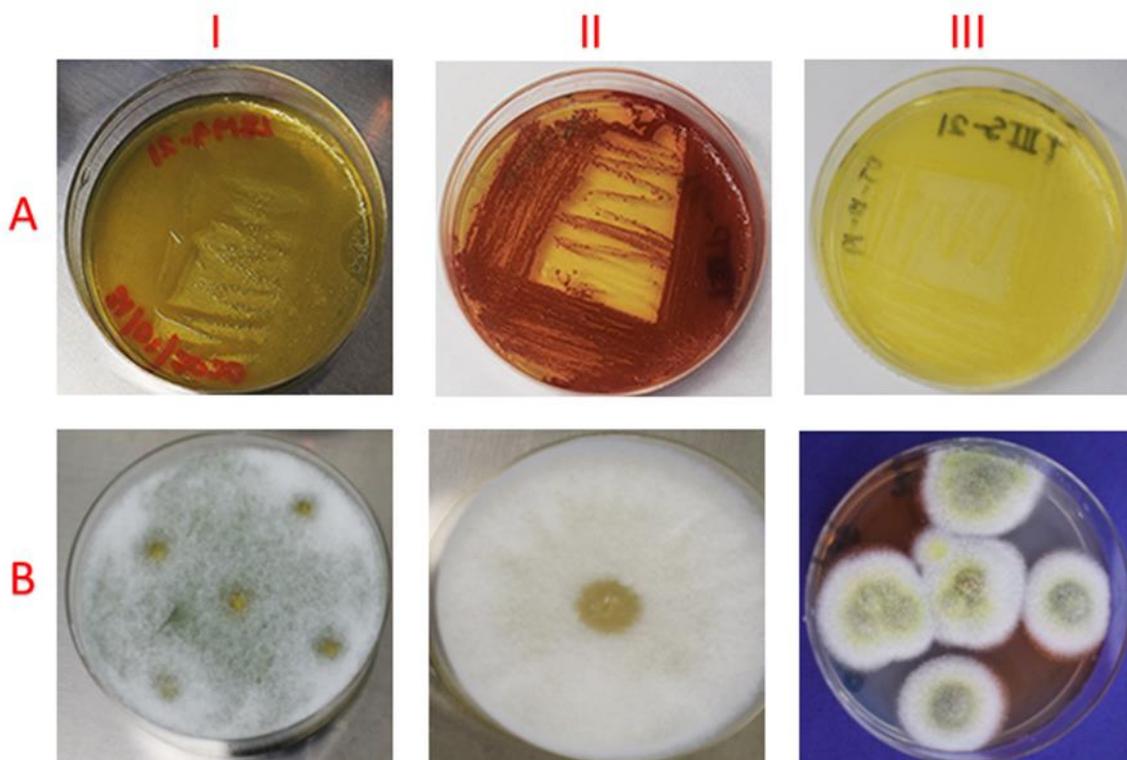
<b>Procedencia de la muestra</b>	<b>Código de la muestra</b>	<b>Bacterias Aisladas</b>	<b>Otros Hongos Aislados</b>	<b>Posibles Trichodermas</b>
Finca santa Cecilia, Bosque	LBM1			
Finca santa Cecilia, Caña	LCM2		1	
Finca santa Anita, Maíz	LMM3		3	
León Finca San José de los Marios, Bosque	LBM4	1	3	
Finca Toro Blanco, Bosque	LBM5		1	
Finca Llanitos de	LBTM6		3	

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

<b>San Luis, Bosque Teca</b>				
<b>Finca Llanitos de San Luis, Bosque Roble</b>	LBRM7			
<b>Bosque Eucalipto</b>	LBEM8		2	
<b>Finca Los Ángeles, Bosque Bambú</b>	LBBM9		3	
<b>Finca Aguas Calientes, Caña</b>	LCM10			
<b>TOTAL</b>			<b>17</b>	

Para lograr una buena identificación de los microorganismos basándose en sus características morfológicas es necesario obtener un cultivo aislado totalmente puro. A continuación, en la **Figura 7.2** se muestra un pequeño fragmento de los microorganismos aislados puros provenientes de ambos lugares de muestreos (Terrabona, Matagalpa y León), tanto de hongos filamentosos como de bacterias.

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas



**Figura 7. 2.** Representación de los cultivos axénicos. **A I:** Aislado bacteriano procedente de León con el código LBM4-21, **AII-AIII:** Aislados bacterianos procedentes de Terrabona, Matagalpa con los códigos T7P-21 y T3S-21, **BI-BII:** Aislados de hongos filamentosos procedentes de Terrabona, Matagalpa y posibles *Trichodermas* con los codigos 77TG-14 y 12TG-21 y **BIII:** Aislado de hongo filamentoso procedente de León con el codigo 23LC-12 (Fuente Propia).

En la **Figura 7.2** se puede observar el crecimiento en placa de diferentes cultivos axénicos tanto de bacterias como de hongos, de tal forma que se denoten correctamente los distintos cultivos puros que se obtuvieron. Se observan en la parte superior tres bacterias y en la parte inferior tres hongos filamentosos. Mau, *et al.*, 2011, aisló una biomasa microbiana muy diversa de suelos provenientes de una estación biológica llamada “Río Macho” ubicado en Cartago, Costa Rica. Los separaron en grupos morfortipos de Gram negativos, Gram positivos esporulados, Gram positivos no esporulados y bacterias filamentosas. En la presente investigación se aislaron microorganismos bacterianos que provenían de las muestras a analizar, sin embargo, no contribuye a la misma como tal, sino, a investigaciones futuras que se pueden llevar a cabo en la institución. Era importante tomar en cuenta todo lo que se lograra obtener durante el procedimiento de aislamiento y esto cumple con el primer objetivo de la investigación, el cual es ampliar la base de datos de microorganismos del laboratorio de biotecnología del PIENSA y deberá considerarse como un plus a la luz de la presente investigación. Todas las bacterias aisladas (7 en total) obtenidas en cultivo axénico se encuentran en el **Anexo 6**.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

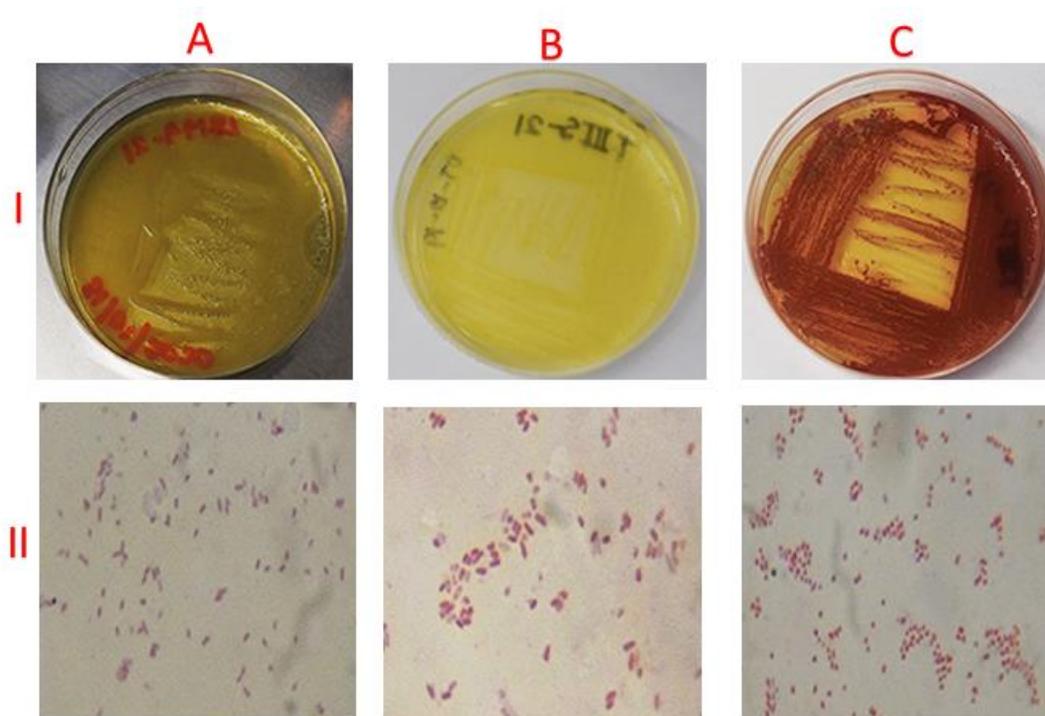
El género *Trichoderma* es un grupo de hongos aislados comúnmente del suelo que se producen asexualmente, muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos (Harman, *et al.*, 1981). Esto proporcionó la respuesta a la obtención de hongos entre los microorganismos aislados, que contenían características de ser particularmente *Trichodermas*, con su morfología en el crecimiento (vista en placa y al reverso) así como también su observación de las esporas al microscopio.

### 7.1.4 Pruebas morfológicas desarrolladas para la identificación microbiana

#### 7.1.4.1 Identificación de bacterias

Los rasgos morfológicos (estructurales) han ayudado a los taxonomistas por muchos años a clasificar microorganismos. Los microorganismos superiores tienen rasgos anatómicos tan diferentes que pueden ser fácilmente utilizados en su clasificación, pero con respecto a los microorganismos, éstos lucen bajo el microscopio tan similares que se dificulta su clasificación. Es decir, estos microorganismos que se ven tan parecidos bajo un microscopio, pueden diferir en propiedades bioquímicas, fisiológicas y/o serológicas. Sin embargo, aun cuando la morfología celular dice poco sobre las relaciones filogenéticas, sigue siendo útil para la identificación bacteriana. Se realizaron registros de los resultados que se obtuvieron al hacer tinciones de Gram a bacterias previamente aisladas en este trabajo, de tal forma que lo podemos ver a continuación (Rosas, 2015). En la **Figura 7.3** se observan cultivos bacterianos puros con su respectiva tinción de Gram para clasificarlas como bacterias Gram positivas o negativas, el total de los microorganismos bacterianos obtenidos se pueden observar en el **Anexo 6**, así mismo, en el **Anexo 7** se pueden observar sus características morfológicas macro y microscópica.

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas



**Figura 7. 3.** Morfología macroscópica de las bacterias en placa Petri y su observación microscópica con objetivo de 100x de la tinción de Gram. **AI-AII:** Bacteria Gram positiva, **BI-BII** y **CI-CII:** Bacteria Gram negativa (Fuente Propia).

En la **Figura 7.3** se observa la morfología macroscópica y microscópica de algunas bacterias aisladas en el presente trabajo. **AI-AII:** Bacteria Gram positiva de colonias medianas de color amarilla con pigmentación del medio de color verdosa, brillante y cremosa, de forma puntiforme y bordes redondeados. **BI-BII:** Bacteria Gram negativa de colonias pequeñas, planoconvexas, translúcida amarillenta, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados. **CI-CII:** Bacteria Gram negativa de Colonias pequeñas, superficie convexa, de colores fucsia, brillantes y cremosos, de forma de puntiforme y bordes redondeados. Ninguna de las bacterias aisladas en esta investigación fueron identificadas dado que no era de interés la caracterización de ellas, pero si fue importante su respectivo control como cultivo axénico gracias a que esto cumple con el primer objetivo en el trabajo el cual es ampliar la base de datos de microorganismos del laboratorio de biotecnología del PIENSA.

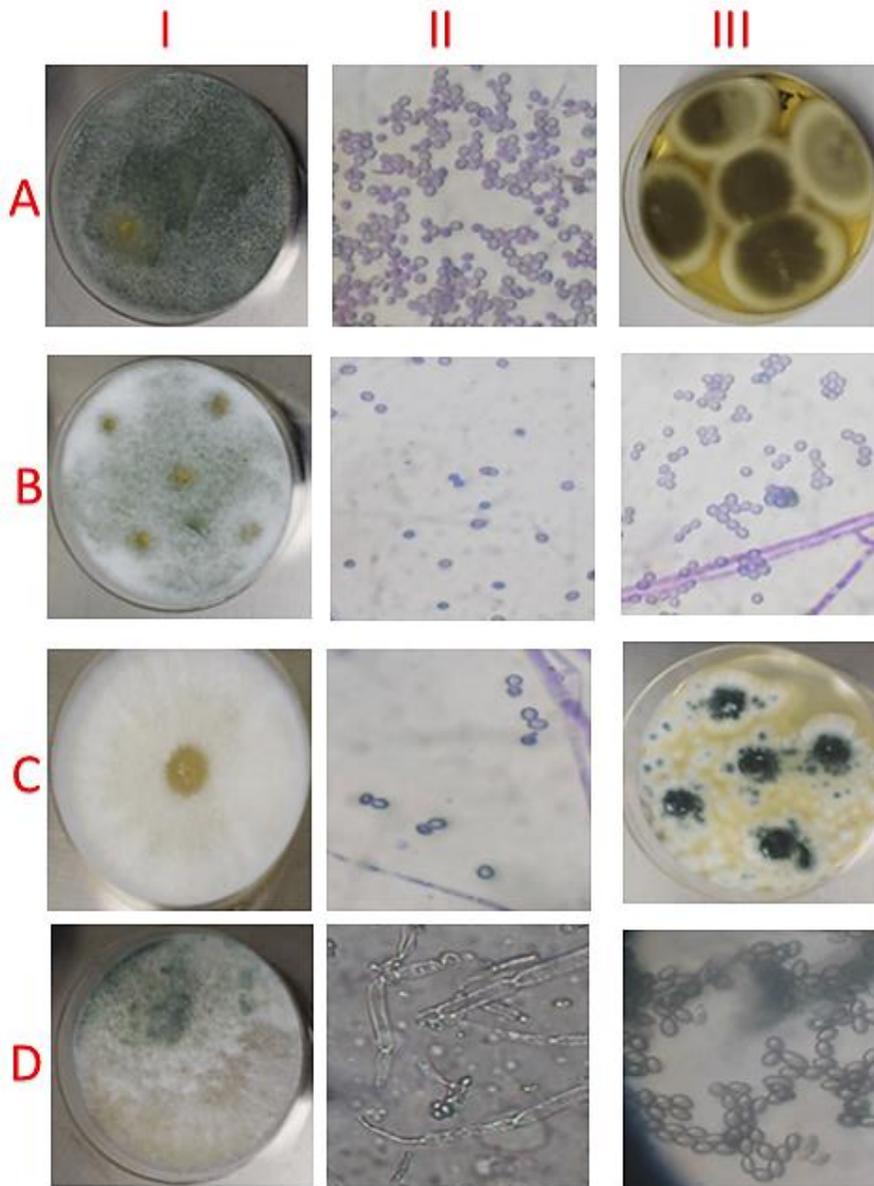
### 7.1.4.2 Identificación de hongos

La identificación y clasificación de los hongos filamentosos preliminarmente está basada en sus rasgos estructurales y morfológicos. Algunos hongos tienen una apariencia tan característica que pueden ser identificados fácilmente, pero en la mayoría de los casos se requiere observar una preparación del hongo al

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

microscopio y estudiar sus características tales como morfología de las hifas, ramificaciones, tipos de esporas, esporangio, etc. (Cárdenas, 2012).

En la **Figura 7.4** se puede observar un pequeño fragmento de los hongos filamentosos obtenidos (un total de 29) los cuales fueron clasificados según sus características microscópicas. Dentro de ellos se seleccionaron 6 hongos como “posibles *Trichodermas*” para su posterior identificación molecular. El resto de hongos filamentosos no identificados y su respectiva observación al microscopio se puede observar en los **Anexos 8, 9 y 10**.



**Figura 7. 4.** Morfología macroscópica de hongos filamentosos provenientes de Terrabona, Matagalpa y su observación microscópica de sus esporas con objetivo de 50x. **A1-A11:** Posible

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

*Trichoderma* con el código 77TG-14 y sus esporas en forma semi ovalada, **BI-BII**: Posible *Trichoderma* con el código 72TG-11 y sus esporas en forma redonda, **CI-CII**: Posible *Trichoderma* con el código 12TG-21 y sus esporas en forma ovalada, **DI-DII**: Posible *Trichoderma* con el código 77TG-21 y sus esporas en forma ovalada, **AIII-BIII**: Código del hongo 51TG-15 y sus esporas en forma redonda y **CIII-DIII**: Código del hongo 20TG-01 y sus esporas en forma ovalada (Fuente propia).

En la **Tabla 7.4** se describen las características morfológicas macro y microscópicas más comunes observadas en cada uno de los hongos que se aislaron previamente en las muestras procesadas utilizadas en este trabajo y se identificaron correctamente. Para los hongos restantes no identificados sus características morfológicas se pueden ver en **Anexos 11, 12 y 13**. Páramo, *et. al.*, 2011, en una extracción de biopelículas de monumentos patrimoniales, obtuvieron un total de más de 40 aislados de hongos filamentosos.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Tabla 7. 4.** Características Macro y Microscópicas de los hongos filamentosos aislados de Terrabona, Matagalpa (fuente propia).

<b>Características morfológicas de hongos filamentosos</b>				
<b>Código</b>	<b>Observación macroscópica</b>			<b>Observación microscópica</b>
	<b>Cultivo en placa</b>		<b>Aspecto del micelio</b>	<b>Forma de las esporas</b>
	<b>Anverso</b>	<b>Reverso</b>		
<b>20TG-01</b>	Verde y contorno blanco, pigmentos blancos.	Crema y contornos más claros, pigmentos claros.	Colonia polvosa, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia seca.	Ovalada y lisa.
<b>51TG-15</b>	Verde y contorno blanco.	Crema con cetros oscuros.	Colonia polvosa, forma circular, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Redonda y lisa.
<b>72TG-11</b>	Blanco con verde y centro de color marrón.	Crema y contornos más oscuros.	Colonia algodonosa, forma circular, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia blanda.	Redonda y lisa.
<b>77TG-14</b>	Verde con blanco y centro marrón.	Crema con centro claro	Colonia algodonosa, forma circular, crecimiento invasivo en la superficie del medio, consistencia blanda.	Semi ovalada y lisa.
<b>12TG-21</b>	Blanco con amarillo y centro marrón.	Crema con centro oscuro	Colonia algodonosa, forma circular, crecimiento invasivo en la superficie del medio, consistencia blanda y viscosa en el centro.	Ovalada y lisa.
<b>77TG-21</b>	Blanco con verde.	crema	Colonia algodonosa, crecimiento invasivo en la superficie del medio, consistencia blanda.	Ovalada y lisa

En los hongos filamentosos se observó la forma de las esporas y la estructura del esporangio característico de los hongos *Trichoderma* que son en forma de botellas, muchas veces se tiende a confundir con los hongos *Penicillium* por lo que el

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

crecimiento en placa es muy similar a la de los *Trichodermas*, sin embargo, la observación al microscopio es fundamental ya que esta denota correctamente las esporas de los hongos que se tienen y ahí sí difieren los esporangios de los hongos *Penicillium* contra los esporangios de los hongos *Trichoderma*, mientras los primeros son en forma de árbol, con un tronco y todas las esporas en forma de racimos en el final del mismo, los *Trichodermas* tienen ramificaciones que terminan en forma de patas de gallo, con tres separaciones y cada una con forma de pico de una botella (Figura 7.5).



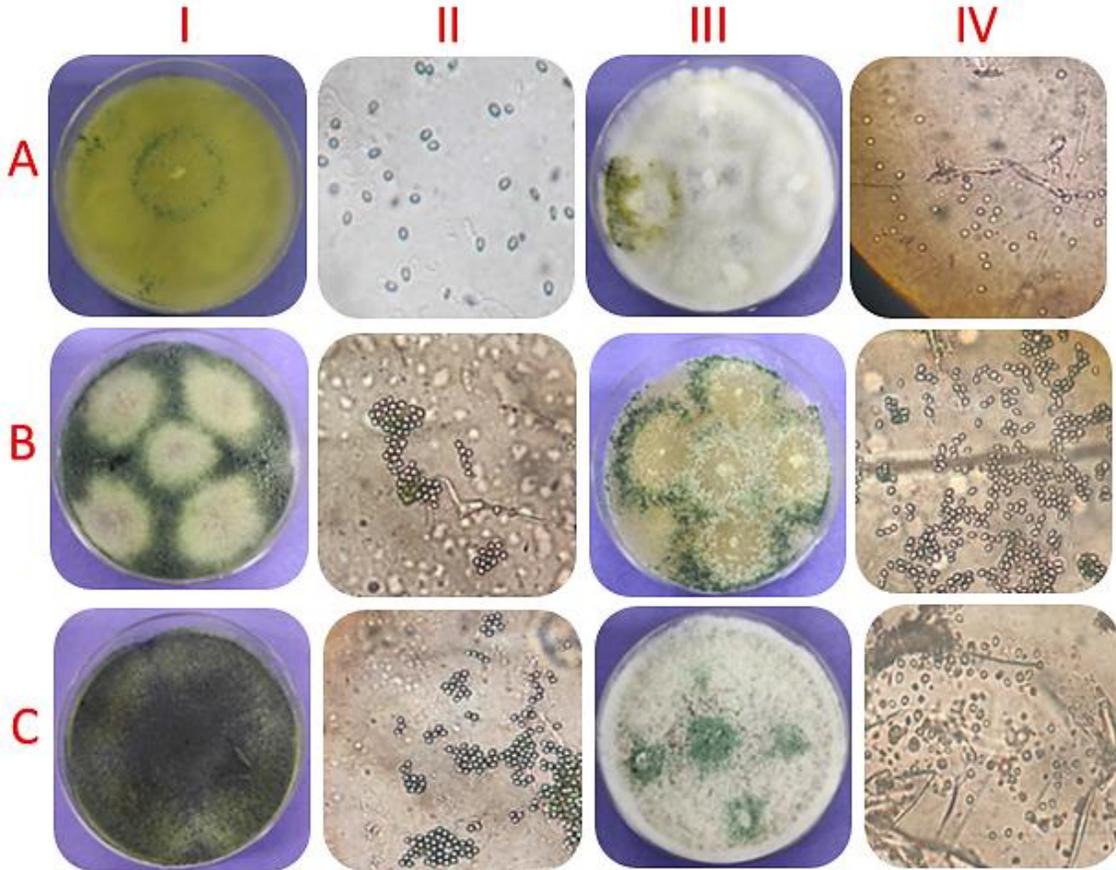
**Figura 7. 5.** Observación al microscopio con objetivo de 50x de hongos filamentosos. **A:** Corresponde al esporangio del hongo 51TG-15 (*Penicillium Oxalicum*) y **B:** Corresponde a las hifas del hongo 72TG-11 (*Trichoderma harzianum*) (Fuente propia).

Rojas, *et. al.*, 2017, aisló un total de 26 cepas nativas de *Trichoderma* a partir de muestras de suelo de cultivo de espárrago, ubicadas en la empresa Agroindustrial Camposol, S.A., Chao, Perú. Por otra parte, Páramo, *et. al.*, 2011, en la cantidad de aislados que obtuvo de monumentos patrimoniales logró aislar e identificar que, en las biopelículas muestreadas en ese momento, coexistían géneros como: *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Trichoderma*, entre otros. Por lo que se corrobora con la bibliografía antes mencionada que la cantidad de aislados y la identificación de las especies microbianas está en dependencia del lugar donde provienen las muestras que se estén analizando y los medios de cultivos empleados para establecer las condiciones de trabajo en general de dicho proceso.

Debido a que los posibles hongos *Trichodermas* aislados de las muestras provenientes de Terrabona y León fueron pocos (6 seleccionados como posibles *Trichodermas*), se completó un lote de 12 muestras con los microorganismos existentes en el laboratorio de biotecnología del PIENSA (Figura 7.6) para cumplir

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

con el segundo objetivo de esta investigación el cual corresponde a la identificación de los microorganismos previamente aislados. En la **Tabla 7.5** se observa la procedencia de los trabajos a partir del cual se aislaron los otros 6 hongos seleccionados como posibles *Trichodermas*, la selección se basó principalmente en el análisis de sus características morfológicas macro y microscópicas y lugar de procedencia, al igual que con los hongos que fueron aislados en este trabajo.



**Figura 7. 6.** Morfología macroscópica de hongos filamentosos provenientes del banco de microorganismos del laboratorio de Biotecnología del PIENSA-UNI y su observación microscópica de las esporas con objetivo de 50x. **AI-AII:** QIVD-12 y sus esporas en forma ovalada, **AIII-AIV:** T2 y sus esporas en forma redondas, **BI-BII:** CIXD-07 y sus esporas en forma redonda, **BIII-BIV:** CIXD-08 y sus esporas en forma semi ovalada, **CI-CII:** MIVD-08 y sus esporas en forma redonda y **CIII-CIV:** M5-3 y sus esporas en forma semi ovaladas (Fuente propia).

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Tabla 7. 5.** Resumen de la selección de posibles hongos *Trichodermas* del laboratorio de Biotecnología del PIENSA con sus respectivas características macro y microscópicas que fueron enviados al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Centroamericana (UCA) (Fuente propia).

<b>Código de muestreo</b>	<b>Procedencia de la muestra</b>	<b>Documento de referencia</b>	<b>Características del hongo</b>
<b>CIXD-08</b>	Reserva natural el Chocoyero-El Brujo de Ticuantepe.	Bioprospección microbiana para el desarrollo de aplicaciones ambientales.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En el anverso es de color verde oscuro con blanco y el en reverso tiene pigmentación amarillenta difusible en el medio.</li> <li>• Colonia aterciopelada, forma circular, plana, extendida, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia seca y mucoide.</li> </ul> <p>Sus esporas son semi ovaladas y lisas.</p>
<b>CIXD-07</b>	Reserva natural el Chocoyero-El Brujo de Ticuantepe.	Bioprospección microbiana para el desarrollo de aplicaciones ambientales.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En el anverso es de color verde oscuro con blanco y el en reverso es crema con puntos negros.</li> <li>• Colonia aterciopelada, forma circular, plana, extendida, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia seca y mucoide.</li> </ul> <p>• Sus esporas son redondas y lisas.</p>
<b>MIVD-08</b>	Planteles mineros, La libertad-Chontales.	Bioprospección microbiana dirigida a identificar microbiológica y molecularmente microorganismos de utilidad agrícola e industrial en Nicaragua.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En el anverso es de color verde con blanco y el en reverso es crema con centro más oscuro.</li> <li>• Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen desflecado, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.</li> </ul> <p>• Sus esporas son redonda y lisa.</p>
<b>T2</b>	Rizosfera de azúcar y plátano, León.	Caracterización y evaluación de <i>Trichodermas</i> spp como promotor de crecimiento vegetal e inhibidor de hongos fitopatógenos asociados al tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) y	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En el anverso blanco y el en reverso es crema.</li> <li>• Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia blanda.</li> </ul> <p>• Sus esporas son redonda y lisa.</p>

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

		chiltoma ( <i>Capsicum annuum</i> ) (Tesis en publicación).	
<b>QIVD-12</b>	Quesera artesanal, La libertad-Chontales.	Bioprospección microbiana dirigida a identificar microbiológica y molecularmente microorganismos de utilidad agrícola e industrial en Nicaragua.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En el anverso es de color verde y pigmento amarillo difusible en el medio y el en reverso es amarillo intenso y pigmento difusible en el medio de color amarillento.</li> <li>• Colonia granulosa, forma circular, plana, extendida, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia seca y mucosidad.</li> <li>• Sus esporas son ovals y lisa.</li> </ul>
<b>M5-3</b>	Rizosfera de azúcar y plátano, León.	Caracterización y evaluación de Trichodermas spp como promotor de crecimiento vegetal e inhibidor de hongos fitopatógenos asociados al tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ) y chiltoma ( <i>Capsicum annuum</i> ) (Tesis en publicación).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En el anverso es de color blanco con verde y en el reverso es de color crema.</li> <li>• Colonia aterciopelada, forma circular, plana, extendida, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia blanda.</li> <li>• Sus esporas son semi ovaladas y lisa.</li> </ul>

### 7.2 Identificación molecular de los hongos seleccionados

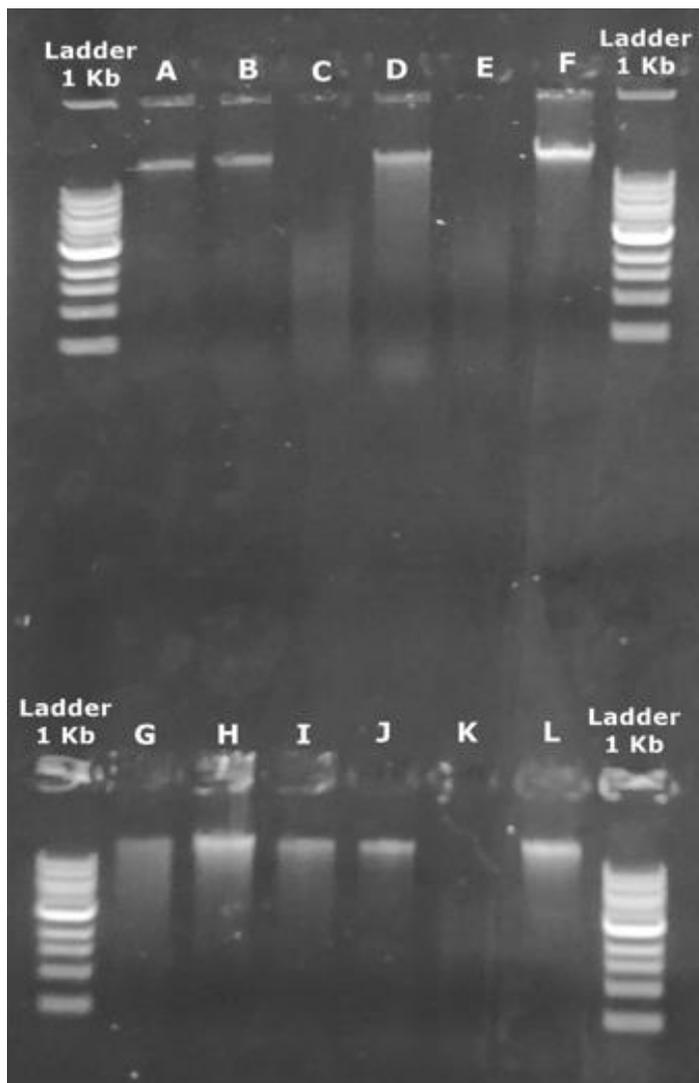
#### 7.2.1 Extracción de ADN, PCR y secuenciación

La amplificación de los espaciadores internos transcritos conocidos como ITS por sus siglas en inglés (Internal Transcribed Spacer) contenidos en el ADN ribosomal (ADNr), es una de las metodologías de diagnóstico molecular más utilizadas para diferenciar entre géneros, especies y variedades de hongos relacionados, difíciles de distinguir fenotípicamente, gracias a que se han derivado cebadores específicos de sus secuencias, sin embargo, es una herramienta poco utilizada ya que genera altos costos y largos periodos de tiempo para la obtención de resultados (Pinzón, *et al.*, 2013).

Los hongos seleccionados (CIXD-08, CIXD-07, MIVD-08, T2, QIVD-12, M5-3, 20TG-01, 51TG-15, 72TG-11, 77TG-14, 12TG-21 y 77TG-21) fueron enviados al laboratorio de biología molecular de la Universidad Centroamericana (UCA) para la extracción de ADN genómico (**Tabla 7.6**), los resultados obtenidos no fueron los

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

esperados ya que algunas bandas se observaban muy pobres en contenido de ADN (A, B, G), o casi nada (C, E, K), a como se muestra en la **Figura 7.7**.



**Figura 7.7.** Extracción de ADN genómico en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Centroamericana (UCA) de las 12 muestras de hongos seleccionadas como posibles hongos *Trichodermas* (Fuente propia).

La secuenciación se realizó mediante la compañía Macrogen, debido a que la extracción de ADN genómico de varios hongos fue muy pobre no se obtuvo la amplificación del PCR, la razón de esto es que la cantidad o la concentración de ADN en la muestra cargada al gel en la electroforesis era insuficiente, o bien que el ADN al momento de ser analizado ya estaba degradado, debido a esto, no se lograron identificar las especies de hongos que fueron catalogados con los códigos que se observan en la **Figura 7.7** (A, B, C, E, G, K). La identificación molecular de los hongos se realizó a través de estos mismos PCR de las regiones ITS1-ITS4, y dichos hongos que sí pudieron ser secuenciados, se llevaron al laboratorio de

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

biotecnología del PIENSA de tal forma que, haciendo uso de la bioinformática se llevó a cabo la identificación final.

**Tabla 7. 6.** Hongos seleccionados para la amplificación de PCR, mediante la compañía MACROGEN. Los hongos con la numeración 1, 2, 6, 7, 11 y 12 son aislados del presente trabajo, los demás son hongos tomados del banco de microorganismos del laboratorio del Biotecnología del PIENSA-UNI.

<b>Número</b>	<b>Código de muestreo</b>	<b>Código de análisis</b>	<b>Observaciones</b>
1	20TG-01	A	Si se obtuvo amplificación de PCR.
2	51TG-15	B	Si se obtuvo amplificación de PCR.
3	CIXD-08	C	No se obtuvo amplificación de PCR.
4	CIXD-07	D	No se obtuvo amplificación de PCR.
5	MIVD-08	E	No se obtuvo amplificación de PCR.
6	72TG-11	F	Si se obtuvo amplificación de PCR.
7	77TG-14	G	No se obtuvo amplificación de PCR.
8	T2	H	Si se obtuvo amplificación de PCR.
9	QIVD-12	I	No se obtuvo amplificación de PCR.
10	M5-3	J	No se obtuvo amplificación de PCR.
11	12TG-21	K	No se obtuvo amplificación de PCR.
12	77TG-21	L	No se obtuvo amplificación de PCR.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

En la **Tabla 7.6** se muestran los 12 hongos que fueron enviados a secuenciar, con la observación final en donde se denota si se obtuvo o no amplificación de PCR para la identificación de dichos hongos. Se observa que fueron 4 hongos los que se lograron amplificar de los 12 totales que se enviaron a secuenciar. Los otros 8 hongos que no se lograron secuenciar se agregaron a la base de datos de microorganismos del PIENSA para su cuidado y constante activación de las cepas para que en futuras investigaciones las utilicen. Los hongos que no pudieron ser secuenciados ni identificados (77TG-14, 77TG-21 y 12TG-21) se anexaron al banco de microorganismos del laboratorio de biotecnología del PIENSA y de acuerdo a sus características macroscópicas (observaciones del anverso y reverso de la placa petri) y microscópicas (estructuras de sus hifas, esporangio, esporas, etc.), se garantiza que son del género *Trichodermas* (**Figura 7.4**).

### **7.2.2 Construcción del árbol filogenético**

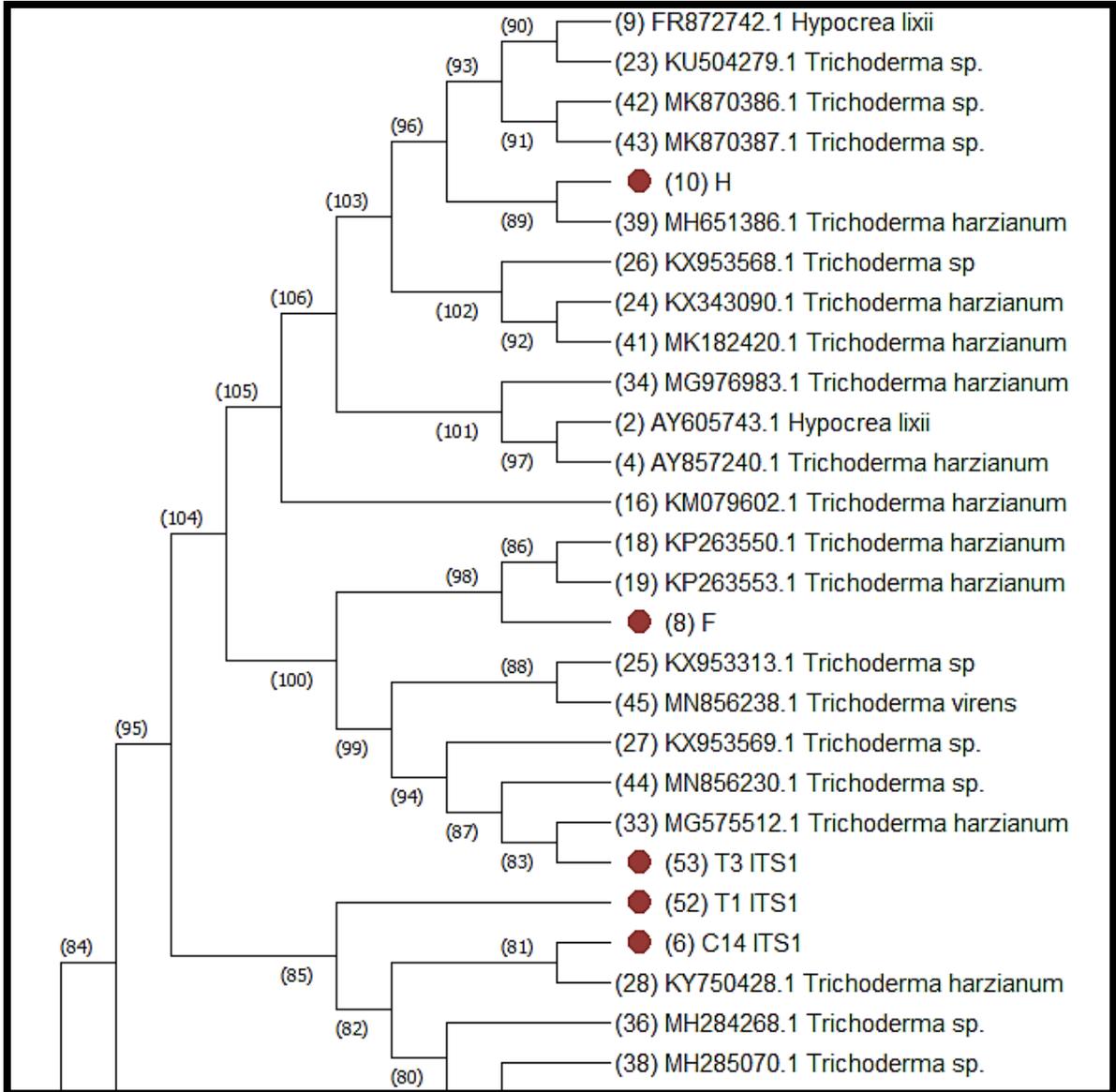
Para la realización del árbol filogenético en esta investigación se tomaron secuencias de hongos previamente identificados como *Trichoderma*, que ya existían en el banco de microorganismos del laboratorio del PIENSA, ahí se encontraban un total de 6 hongos y todos con sus respectivas secuencia e identificación, estos hongos eran el T1, T2, T3, CVD-06, CIXD-11 Y QIVD-12, a estos 6 hongos secuenciados se le agregaron los 3 hongos que fueron amplificados en la presente investigación (20TG-01, 51TG-15, 72TG-11). Las 9 secuencias analizadas (corregidas y alineadas) que fueron utilizadas para la ejecución del árbol filogenético se presentan en formato FASTA en el **Anexo 14** y también se encuentran descritos en su totalidad en la **Tabla 7.7**.

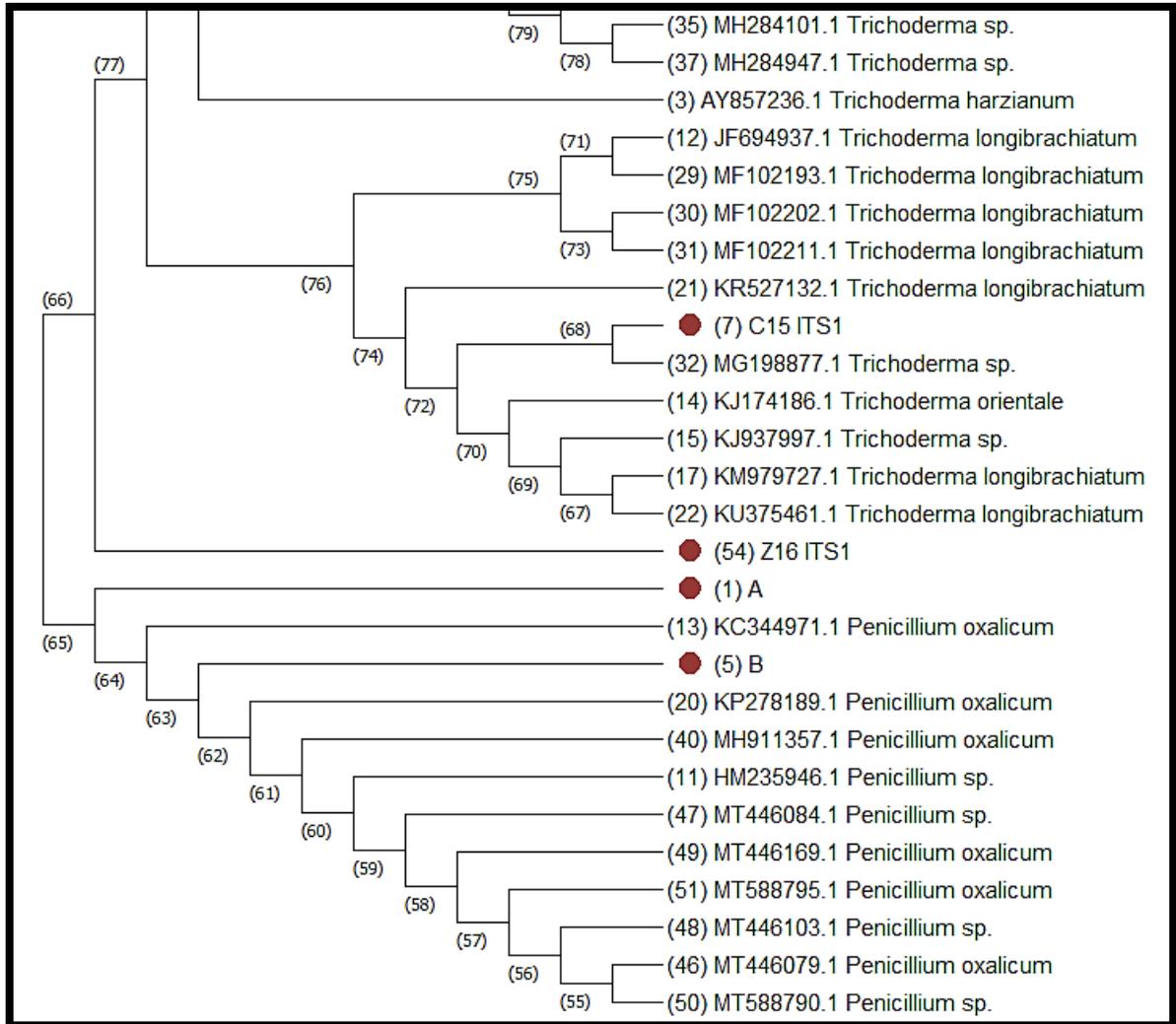
## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Tabla 7. 7.** Resumen de los 9 hongos secuenciados para la construcción del árbol filogenético (Fuente propia).

<b>Código del Microorganismo</b>	<b>Lugar de procedencia</b>	<b>Referencia</b>	<b>Autor(es)</b>
<b>20TG-01, 51TG-15 y 72TG-11</b>	Terrabona	Desarrollo de un proceso de producción de <i>Trichodermas</i> nativas previamente identificadas de diferentes regiones de Nicaragua.	López y Rodríguez, 2021
<b>T1, T2 y T3</b>	León	Identificación morfológica y molecular de especies autóctonas <i>Trichoderma</i> spp., aisladas de suelos de importancia agrícola.	Sánchez, <i>et al.</i> , 2021
<b>CVD-06 y CIXD-11</b>	Ticuanatepe	Bioprospección microbiana para el desarrollo de aplicaciones ambientales.	Ríos, 2019
<b>QIVD-12</b>	La libertad-Chontales	Bioprospección microbiana dirigida a identificar microbiológica y molecularmente microorganismos de utilidad agrícola e industrial en Nicaragua.	Delgado y Fonseca, 2019

*Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*





**Figura 7. 8.** Árbol filogenético construido con el programa MEGAX64. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitios. El análisis de las secuencias se realizó utilizando el método del vecino más cercano (Fuente propia).

Haciendo uso de la **Figura 7.8**, se obtuvo la tabla de identificación final para cada uno de los aislados (**Tabla 7.8**). La lectura del árbol filogenético para la determinación del género y especie de los hongos trabajados, fue la siguiente: Se tomó el clado más cercano al hongo en cuestión, en el ejemplo del hongo B ubicado al final en la imagen del árbol filogenético, se puede observar que esta rama está completamente unida a su vecino más cercano, un *Penicillium oxalicum*. Es importante tener en cuenta el número que se muestra en cada clado del árbol filogenético, puesto que este describe la distancia evolutiva a la que se encuentra uno de otro; este número es importante a tomar en cuenta siempre que se le asigne un nombre a un microorganismo que está siendo identificado por esta vía, además de la frecuencia obtenida según el blast corrido en el NCBI.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Tabla 7. 8.** Identificación molecular de 9 cepas de hongos filamentosos. Los 3 primeros hongos aislados son provenientes de las muestras de Terrabona, Matagalpa y los otros 6 hongos son provenientes del banco de microorganismos que dispone el laboratorio de biotecnología del PIENSA (Fuente propia).

<b>Código Microorganismos</b>	<b>Lugar de muestreo</b>	<b>Código de Secuencia</b>	<b>Vecino más cercano (número de acceso)</b>	<b>Max. Score</b>	<b>Iden. Máx. (%)</b>	<b>Identidad Final</b>
<b>20TG-01</b>	Terrabona (Área de Ganado)	A	<i>Penicillium oxalicum</i> (KC344971.1)	1044	100	<i>Penicillium oxalicum</i>
<b>51TG-15</b>	Terrabona (Cultivo de Pepino)	B	<i>Penicillium oxalicum</i> (KP278189.1)	1096	100	<i>Penicillium oxalicum</i>
<b>72TG-11</b>	Terrabona Guanajiquil (Cultivo de tomate)	F	<i>Trichoderma harzianum</i> (KP263553.1)	1103	100	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>T2</b>	León (Rizosfera de azúcar y plátano)	H	<i>Trichoderma harzianum</i> (MH651386.1)	1123	100	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>T1</b>	León (Rizosfera de azúcar y plátano)	T1	<i>Trichoderma harzianum</i> (KY750428.1)	1033	99	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>T3</b>	León (Rizosfera de azúcar y plátano)	T3	<i>Trichoderma harzianum</i> (MG575512.1)	839	96	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>CVD-06</b>	Roca con biopelícula de la reserva natural el Chocoyero	C14	<i>Trichoderma harzianum</i> (KY750428.1)	1033	99	<i>Trichoderma harzianum</i>
<b>CIXD-11</b>	Tronco degradado de la reserva natural el Chocoyero	C15	<i>Trichoderma Sp.</i> (MG198877.1)	1062	99	<i>Trichoderma Sp.</i>
<b>QIVD-12</b>	Chontales (Quesera Artesanal)	Z16	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (KU375461.1)	883	99	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

La identificación obtenida en el árbol filogenético se elaboró en el programa MEGAX64 utilizando el método del vecino más cercano. Los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de los genes. Las secuencias ITS son una de las más utilizadas en la identificación, como códigos de barras estándar para hongos. En la **Tabla 7.8** presenta un consolidado de la identificación molecular de los aislados obtenidos en el presente trabajo, el cual fueron 2 *Penicillium oxalicum* (20TG-01, 51TG-15) y 1 *Trichoderma harzianum* (72TG-11), también se presentan los demás hongos que fueron identificados en trabajos anteriores, estos son 4 *Trichodermas harzianum* (T1, T2, T3 y CVD-06), 1 *Trichoderma* sp. (CIXD-11) y 1 *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12). Sánchez, *et al.*, 2021, identificó un total de 17 aislados que pertenecían al género *Trichoderma* entre las especies: *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. breve*, *T. harzianum*, *T. virens* y *T. songyi*, dichos aislados identificados por vía molecular, procedían de diferentes regiones del país y en diferentes tipos de suelo como son: cultivos de tomate, sandía, guayaba y mayormente de cultivos de plátano.

Por otro lado, Moya, *et al.*, 2014, logró obtener un total de 95 cepas de *Trichodermas* en suelos de diferentes tipos de cultivos y finalmente, Hernández, *et al.*, 2011, logró aislar un total de 75 cepas de *Trichodermas* provenientes de suelos de cultivo de piña, caña de azúcar y plátano. En la presente investigación se obtuvieron aislados de *Trichodermas* procedentes de cultivos de tomate, rizósfera de azúcar y plátano, lo que indica que los hongos del género *Trichoderma* crecen en suelos de diferentes cultivos, sin embargo, hay una gran diferencia en cuanto al número de aislados que se obtuvieron en esta investigación y los obtenidos en la citadas anteriormente (Sánchez, *et al.*, 2021; Moya, *et al.*, 2014 y Hernández, *et al.*, 2011), esto se debe a muchos factores bióticos y abióticos como la temperatura, humedad, iluminación, etc., e incluso las condiciones de los suelos donde crecen los diferentes cultivos influye grandemente al momento de analizar las mismas y juegan un papel muy importante en el crecimiento del hongo. También, se pueden presentar factores externos que influyen en la identificación molecular, como ejemplo, una mala técnica al momento de realizar la extracción de ADN genómico de los hongos y por tal razón no lograr una amplificación de las secuencias, por ende, no se obtendrían especies de *Trichodermas* identificadas. Las especies de *Trichoderma* permiten la colonización y el establecimiento en hábitats diversos, modificando así la amplitud ecológica de las mismas, lo que implica que se encuentra una amplia variabilidad genética en ellas. Cabe recalcar que en esta investigación fue de mucha importancia la obtención de hongos *Trichodermas*, ya que en este se basa el tercer y último objetivo de reproducción masiva.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

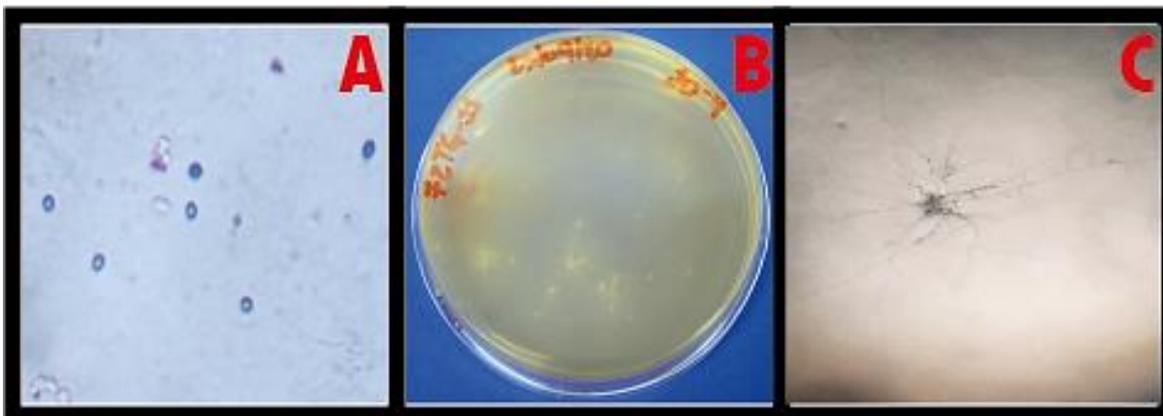
### 7.3 Preparación de medios de cultivo (sustratos sólidos) y reproducción masiva de hongos *Trichodermas*

Para la reproducción de los hongos previamente identificados, se seleccionaron los hongos de interés para cumplir con los objetivos de esta investigación. Primeramente, se centra en los que arrojaron ser *Trichodermas*, por lo que los hongos 20TG-01 y 51TG-15 que resultaron ser *Penicillium oxalicum* fueron descartados de algún proceso de reproducción. Los hongos *Trichodermas* totales identificados fueron 7, de estos se eligió un total de 5 hongos a trabajar, basándose en el lugar de procedencia y la especie de los *Trichodermas*. En el caso del *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12) y el *Trichoderma sp.* (CIXD-11), se decidieron trabajar por ser de una especie diferente de *Trichoderma* y por haber quedado a nivel de género, respectivamente; mientras que en el caso de los 5 *Trichodermas harzianum*, se tomaron 3 de ellos solamente, donde, el T1, T2 y T3 tienen el mismo lugar de procedencia y misma especie de *Trichoderma harzianum*, por lo que se seleccionó el hongo T3, el hongo 72TG-11 se seleccionó por ser parte de los aislados directamente de esta investigación y finalmente el hongo CVD-06 fue seleccionado por tener un lugar de procedencia distinto a los anteriores que también arrojaron ser *Trichoderma harzianum*.

#### 7.3.1 Cultivo monospóricico

Una vez realizado el procedimiento descrito en la metodología como el proceso de cultivo monospóricico (acápite 6.3.3.), se determinó que la dilución ideal para obtener el crecimiento de esporas lo suficientemente aisladas unas de otras son de  $10^{-3}$  como se puede observar en la **Figura 7.9**. Cabe mencionar que el valor fue determinado gracias a una serie de repeticiones de dicho procedimiento. Echeverría, 2006, utilizó el procedimiento de cultivo monospóricico para separar una espóra de un cultivo multiespóricico, de tal forma que asegure la procedencia de la germinación limpia y sin contaminantes del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. El método de cultivo monospóricico garantiza la calidad del aislado, certifica que el aislado se encuentre libre de contaminación y al ser un método barato y eficaz, fue realizado con la finalidad de obtener un crecimiento puro a partir de una espóra para cada hongo a reproducir.

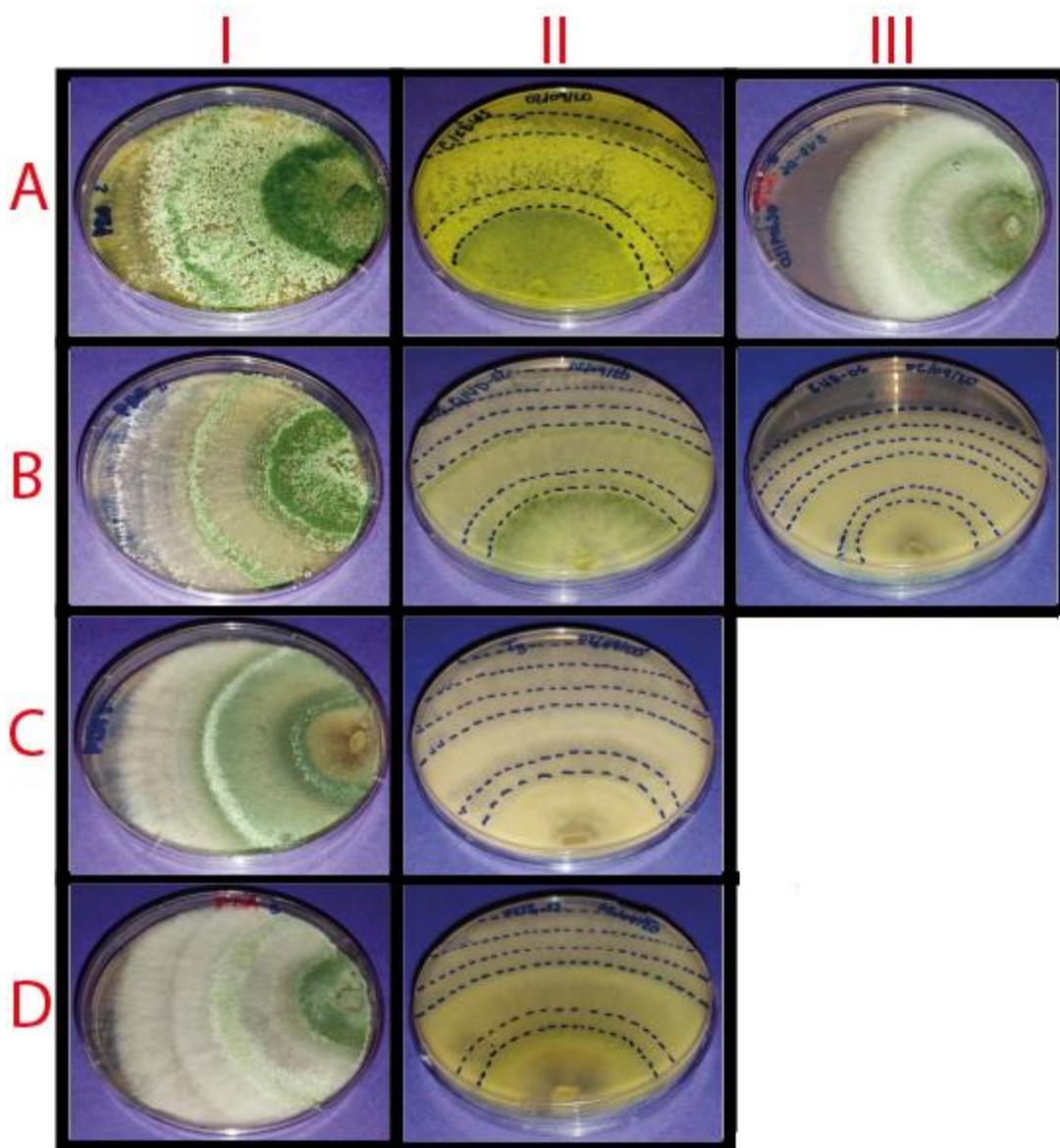
## Desarrollo de un proceso de Producción de *Trichodermas*



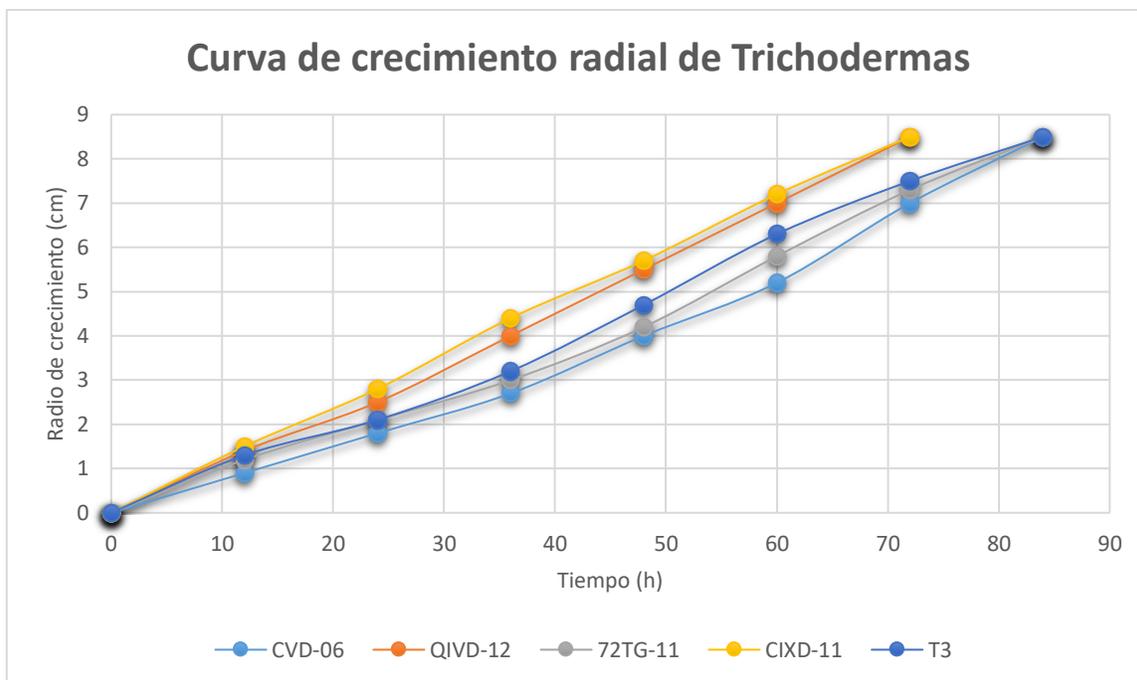
**Figura 7. 9.** Proceso de obtención del cultivo monospórico. **A:** Dilución de las esporas  $10^{-3}$  vista al microscopio con objetivo de 50x, **B:** Crecimiento de las esporas aisladas unas de otras y **C:** Espora germinada totalmente aislada vista al microscopio con objetivo de 50x (Fuente propia).

Es importante mencionar que para la observación de las esporas correctamente separadas no se le debe dejar crecer por más de 48 horas, gracias a que se pueden observar dichas esporas desde las primeras 24 horas, garantizando así el cultivo monospórico proveniente específicamente de una única espora del hongo *Trichoderma*. Un trabajo de investigación con cultivos monospóricos permite que los resultados obtenidos entre diferentes grupos de microorganismos trabajados sean reproducibles (Strobel, *et. al.*, 1996). Pasadas la siembra de una espora única en una placa Petri nueva, se procedió a medir cada 12 o 18 horas el crecimiento de cada cepa en la placa, lo cual se observa en la **Figura 7.10**, dando así también a los resultados demostrados en la **Figura 7.11** una gráfica de crecimiento del radio en centímetros versus el tiempo en horas para todas las cepas de *Trichoderma* utilizada en este proceso investigativo.

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas



**Figura 7. 10.** Anverso y reverso del crecimiento radial de las cepas identificadas. **A I-A II:** *Trichoderma* sp. (CIXD-11), **B I-B II:** *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12), **C I-C II:** *Trichoderma harzianum* (T3), **D I-D II:** *Trichoderma harzianum* (72TG-11) y **A III-B III:** *Trichoderma harzianum* (CVD-06) (Fuente propia).



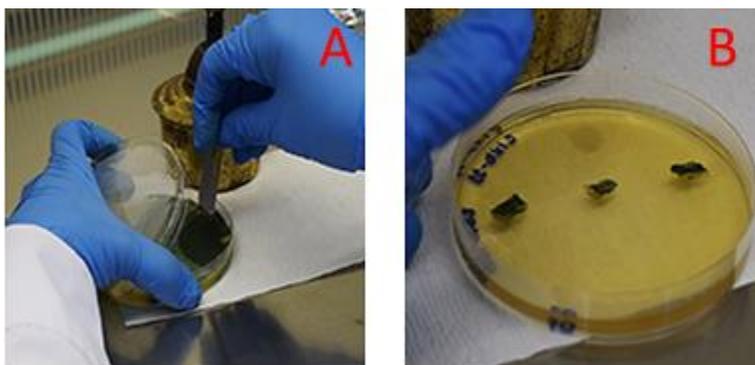
**Figura 7. 11.** Curva de crecimiento radial de todos los hongos *Trichodermas* trabajados. (Fuente propia)

En la **Figura 7.11** se puede observar las diferencias de crecimiento entre todas las cepas de *Trichodermas* que se utilizaron para la reproducción masiva. Siguiendo la leyenda que se encuentra en la parte inferior de la gráfica, se observa que el tiempo de crecimiento hasta que los hongos CIXD-11 (*Trichoderma sp.*) y QIVD-12 (*Trichoderma longibrachiatum*) llenaron la placa petri fue de 72 horas, ambos hongos tienen un crecimiento muy similar entre ellos a lo largo de todo el proceso de reproducción masiva, lo que se podría decir que el hongo CIXD-11 identificado a nivel de género podría ser *Trichoderma longibrachiatum*, sin embargo, esto se podría confirmar realizando nuevamente la identificación molecular. Por otro lado, los hongos T3, 72TG-11 y CVD-06 (todos identificados como *Trichodermas harzianum*) el tiempo que se llevó en llenar toda la placa petri fue de 84 horas. En cuanto al crecimiento radial se puede observar que el comportamiento de las cepas varía en dependencia de la especie y del lugar de procedencia, por ejemplo, los hongos CIXD-11 y QIVD-12 a las 24 horas después de inoculada la espóra tienen un radio de crecimiento de 2.8 y 2.5 cm, respectivamente, aunque la diferencia entre los radios es mínima ambos tienen el máximo crecimiento radial de 8.5 cm a las 72 horas. Por último, con respecto a las cepas T3, 72TG-11 y CVD-06 después de las 24 horas de inoculada la espóra tienen un radio de crecimiento de 2.1, 2.1 y 1.8 cm, respectivamente, es el mismo comportamiento de las otras dos cepas (CIXD-11 y QIVD-12) donde el máximo crecimiento radial de 8.5 cm fue a las 84 horas. Villa y Espín, 2012, analizaron la cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, en donde utilizaban diferentes medios de cultivos para el

## Desarrollo de un proceso de Producción de *Trichodermas*

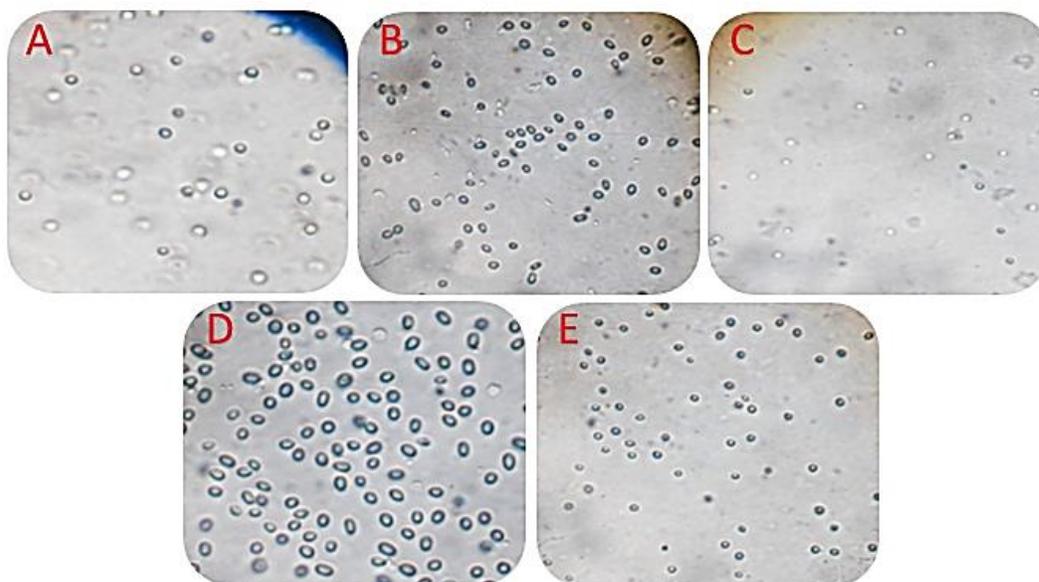
crecimiento de este. Observaron y concluyeron que el mejor sustrato para el crecimiento del hongo (Tallo o aserrín), así como también el mejor medio de cultivo (PDA); por otra parte, Chavarría, 2016, analizó el ritmo de crecimiento de aislados de *Trichodermas spp.* Concluyendo, que las especies de *Trichodermas* crecen diferentes y tienen un rango de crecimiento de 60 a 72 horas, lo cual son valores cercanos a los obtenidos en la presente investigación.

La cinética de crecimiento radial de un hongo permite tener la información del comportamiento de un hongo específico, en las condiciones con las que se requiere trabajar, para que de esta forma, se tenga un manejo total del hongo en cada etapa, para su máximo aprovechamiento; entender cuando esté totalmente desarrollado, en qué momento sus esporas estén lo más intactas posibles, etc., esto permitió llevar a cabo la reproducción del hongo *Trichoderma*, cuando éste presenta el crecimiento indicado. Las características del ritmo de crecimiento encontradas en los diferentes aislados se fundamentan con lo expresado con otros autores en que *Trichoderma* es de fácil aislamiento y de crecimiento rápido en muchos medios de cultivos y sustratos (Sivan & Chet, 1989). La tasa de crecimiento es una de las características principales a tomar en cuenta, para evaluar un agente de control biológico, el crecimiento rápido de un aislado es una característica importante al momento de realizar una reproducción masiva del hongo en sustratos sólidos y para la obtención de un producto formulado, con intenciones de uso en programas de control biológico de hongos fitopatógenos. Cada bolsa de sustrato orgánico fue inoculada con una placa de hongo totalmente esporulada proveniente de una sola espora a como se muestra en la **Figura 7.12**, esto se realizó con el fin de reducir contaminación por manipulación, sin embargo es importante mencionar que dicho tiempo de crecimiento radial es distinto para cada especie de *Trichoderma*, sin embargo, todos fueron reproducidos en el mismo periodo de tiempo. En congruencia con esto, se realizó la observación al microscopio de todas las esporas de cada cepa a reproducir, antes de ser inoculadas (**Figura 7.13**).



**Figura 7. 12.** Proceso de reproducción masiva de los hongos *Trichodermas* en placas petri provenientes del cultivo monospórico. **A:** Corte del medio PDA que contienen esporas de los hongos, y **B:** Crecimiento de los hongos en medio PDA donde posteriormente fueron inoculadas en los sustratos orgánicos (Fuente propia).

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas



**Figura 7. 13.** Observación microscópica con objetivo de 50x de las esporas de los hongos utilizados en la reproducción masiva antes de ser inoculadas. **A:** 72TG-11 (*Trichoderma harzianum*), **B:** QIVD-12 (*Trichoderma longibrachiatum*), **C:** T3 (*Trichoderma harzianum*), **D:** CIXD-11 (*Trichoderma sp.*) y **E:** CVD-06 (*Trichoderma harzianum*) (Fuente propia).

En la primera imagen **A** de la **Figura 7.13** se observan que las esporas del *T. harzianum* (72TG-11) son escasas, en comparación a las encontradas para inoculación del *T. longibrachiatum* (**imagen B**, QIVD-12) y las del *Trichoderma sp.* (**Imagen D**, CIXD-11) que se encuentra una gran cantidad de esporas a lo largo de todas las placas de crecimiento de los hongos en cuestión. El comportamiento es realmente interesante en cuanto a los *T. harzianum* se refiere, ya que estos presentan ser de buen desarrollo, sin embargo, a como se observó anteriormente en la **Figura 7.11** necesitan mayor tiempo de crecimiento para su reproducción completa en placa y el *Trichoderma sp.* y *T. longibrachiatum* resultan ser de reproducción más rápida en medio PDA. Cabe recalcar que las esporas inoculadas se encontraban intactas, bien reproducidas en el caso del *Trichoderma sp.* y *T. longibrachiatum* de forma ovalada, mientras los *T. harzianum* se encontraban en crecimiento apreciable más no completo sino hasta pasados los tres días de crecimiento, esto puede afectar en la reproducción de los hongos en cuanto al sustrato que se utilice para la reproducción masiva de las cepas de trabajo.

### 7.3.2 Inoculación de los *Trichodermas* identificados en los sustratos orgánicos para la reproducción masiva

Para la inoculación se siguió el procedimiento descrito en metodología sección 6.3.5.1 donde se utilizó el antibiótico y el Tween 80 al 0.1% estéril para hacer el arrastre de las esporas (**Figura 7.14**) en el cual, para el caso de la variante sin melaza se recuperaron 3 mL de solución que contenían las esporas de la cepa, mientras que en la variante con melaza se realizó un arrastre de esporas de tal

## Desarrollo de un proceso de Producción de *Trichodermas*

forma que se recuperaron entre 5-10 mL de solución, de aquí la diferencia entre ambas variantes.



**Figura 7. 14.** Proceso de inoculación de las esporas en los hongos en los sustratos. A. Aplicación de TWEEN 80 al 0.1% y antibiótico a la placa petri que contiene la cepa totalmente esporulada, B. Arrastre de las esporas con ayuda del aza digralsky y C. Suspensión de las esporas de los hongos donde posteriormente serán inoculadas en los sustratos (Fuente propia).

En todo el proceso de reproducción se tuvieron diferentes observaciones, se tenían un total de 5 cepas de hongos distintas: T3 (*Trichoderma harzianum*), CIXD-11 (*Trichoderma sp.*), QIVD-12 (*Trichoderma longibrachiatum*), CVD-06 (*Trichoderma harzianum*) y 72TG-11 (*Trichoderma harzianum*). Los sustratos son un total de 4: arroz como testigo, maíz, olote de maíz triturado y copra de coco triturada. Cada cepa de hongo fue inoculada en todos los sustratos con su variante: con melaza y sin melaza.

### 7.3.2.1 Sustratos orgánicos de variante sin melaza

A las 24 horas después de sembrados los hongos de trabajo (721TG-11, QIVD-12, CIXD-11, CVD-06 y T3) en placas petri con medio PDA se observaba crecimiento, sin embargo desde el día 1 hasta el día 5 después de la inoculación de los hongos en los sustratos sin melaza, se dejaron reposar las bolsas en un ambiente de oscuridad e iluminación, esto es debido a que el hongo se estaba adaptando a las nuevas condiciones de crecimiento, por lo que en el lapso de esos días no se observaba crecimiento a simple vista (**Figura 7.15**). A los 5 días después de la inoculación el hongo CVD-06 (*Trichoderma harzianum*) en las bolsas con arroz presentaban crecimiento de color blanco con verde esto es característico del crecimiento micelar (**Figura 7.15 inciso C**), se destruyeron estas estructuras (micelios) de forma manual en las bolsas de tal manera que en cada una de ellas hubiera un crecimiento homogéneo, y de esta forma se lograr estresar al hongo para que continúe en la etapa de esporulación (**Figura 7.15 inciso D**), en las bolsas con maíz ocurrió lo mismo que con el arroz, por otro lado en las bolsas con olote de maíz triturado, se observaba menor crecimiento que con el arroz y el maíz, pero de igual forma seguía siendo una cantidad considerable. Finalmente, las bolsas con copra de coco triturada, no presentaron crecimiento alguno, incluso se registra a lo

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

largo de todo el procedimiento de reproducción que la copra de coco triturada no tuvo crecimiento satisfactorio de hongo tanto sin melaza como con melaza. Castro y Rivillas, 2012, habla de que para el desarrollo del metabolismo de *Trichoderma*, este necesita fuentes de carbono difícilmente biodegradables, como ligninas y celulosa; en el caso de la copra de coco posee cantidades de lignina y celulosa en menor porcentaje que en el caso del arroz y el olote. Lo anterior indica que la copra aún con melaza no le entrega los suficientes nutrientes al hongo para su reproducción en comparación con los otros tres sustratos. Por tanto, reproducción masiva de *Trichodermas* en copra de coco es necesario adicionar suplementos que contengan todos los nutrientes necesarios que el hongo necesita para su desarrollo como lo reporta Vaillant, *et al.*, 2016.

A los 12 días de reproducción, con un cambio constante entre luz (8 horas) y oscuridad (16 horas). A partir de los 5 días de inoculado el hongo, y estresándolos manualmente, se observó un cambio importante en la coloración de las bolsas con arroz y maíz de la cepa 72TG-11 (*Trichoderma harzianum*) amarillento y las bolsas con arroz del hongo T3 (*Trichoderma harzianum*) ya se podían cosechar, porque estaba completamente reproducido el hongo (**Figura 7.15 inciso E y F**), por otro lado el olote de maíz por su parte presentaba mucho crecimiento en las bolsas del hongo 72TG-11 (*Trichoderma harzianum*), y también en el hongo T3 (*Trichoderma harzianum*); en cambio en el CIXD-11 (*Trichoderma sp.*) presento un crecimiento escaso y en el hongo QIVD-12 (*Trichoderma longibrachiatum*) registró un crecimiento blanco, donde solo se observaban una especie de manchas blancas a lo largo de la bolsa (**Figura 7.15 inciso G**).. Es importante mencionar que en el proceso de reproducción el hongo estaba completamente desarrollado en todas las bolsas de sustrato para los 19 días después de la inoculación, sin embargo todavía poseían altos contenidos de humedad, por lo que fue necesario secar constantemente el contenido de sustrato inoculado con bolsas de papel craft durante una semana (**Figura 7.15 inciso H**) las cuales absorbieron toda la humedad libre, también se utilizó una mezcla de fécula de maíz con gelatina simple lo permitieron que el proceso de cosecha fuera exitoso (**Figura 7.15 inciso I**).

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas



**Figura 7. 15.** Crecimiento masivo de las esporas de los hongos en los sustratos sin melaza. **A:** Inoculación de las esporas en los sustratos, **B:** Crecimiento a las 24 horas después de inoculado el hongo, **C:** Crecimiento mayormente de micelios de los hongos a los 5 días después de inoculados, **D:** Destrucción de las estructuras de los hongos (micelio), **E:** Esporulación del hongo y crecimiento de micelios a los 12 días después de inoculado el hongo, **F:** Coloración amarillenta del *T. harzianum* en el sustrato maíz triturado, **G:** Crecimiento del *T. harzianum* en el sustrato olote de maíz triturado, **H:** Secado del sustrato colonizado en bolsas de papel craft e **I:** Adición de la mezcla (fécula de maíz y gelatina simple) (Fuente propia).

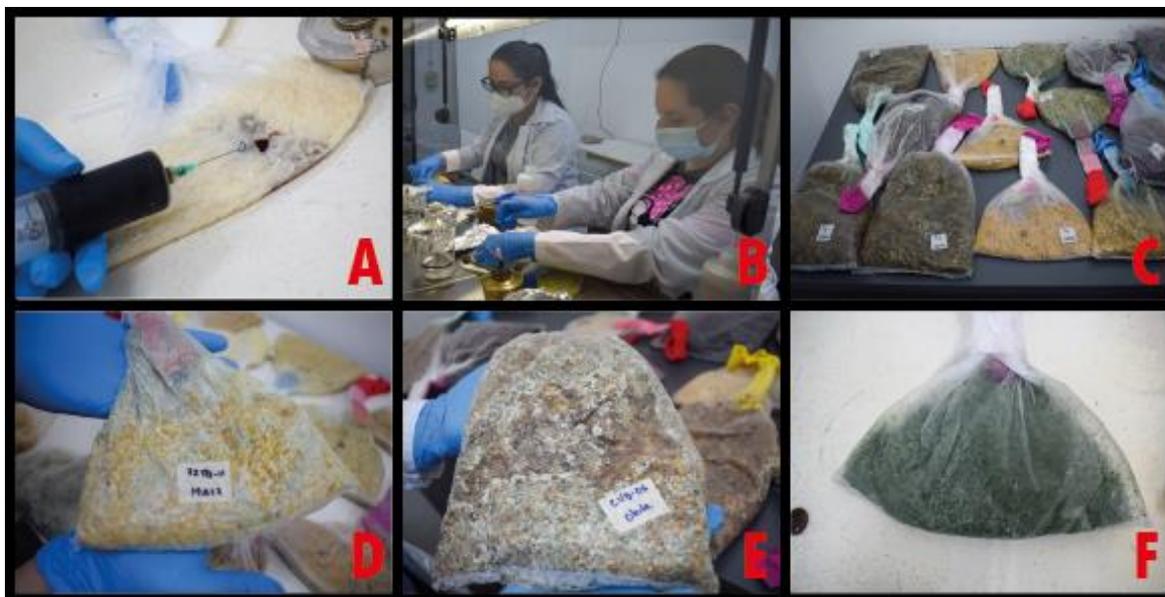
Gómez, 2017, realizó el procedimiento de reproducción masiva mediante fermentación sólida en varios sustratos orgánicos siendo el principal de ellos arroz, el proceso de crecimiento y secado fue durante 7 días cada uno. Por otro lado, Michel, *et al.*, 2008, realizó el mismo procedimiento en 15 sustratos orgánicos diferentes, entre ellos están, arroz, olote de maíz triturado y maíz triturado, donde se obtuvieron resultados excelentes en cuanto al crecimiento de los hongos, el periodo de crecimiento fue de 21 días. En ésta investigación se tomó más tiempo de crecimiento y secado del hongo con respecto a lo reportado por Gómez, 2017; y Michel, *et al.*, 2008 debido a que la humedad en el sustrato era elevada, también se debió a otros factores por ejemplo, temperatura del ambiente, agitación manual de las bolsas, técnica de aireación en el interior de las bolsas (abrir las bolsas para eliminar humedad) y principalmente la concentración inicial del inóculo, por otra

parte estos mismos autores, obtuvieron concentraciones de esporas entre  $10^7$  y  $10^8$ , lo que coincide con lo obtenido en la presente investigación. Finalmente, Vaillant, *et al.*, 2016; Campos, 2009, y Osuna, *et al.*, 2012, realizaron el mismo procedimiento en fibra (copra) de coco, donde se obtuvo un buen crecimiento de los hongos *Trichodermas* adicionando materia orgánica. En la presente investigación no se obtuvo crecimiento en copra de coco, debido a que se necesitan otros nutrientes para que el hongo pueda reproducirse satisfactoriamente, los hongos *Trichodermas* toman nutrientes de los hongos (a los cuales degrada) y de materiales orgánicos ayudando a su descomposición, por lo cual las incorporaciones de materia orgánica y el compostaje lo favorecen, por lo que en los casos donde se usa copra de coco como sustrato, contienen la mayor proporción de estos en su formulación (Ramírez, 2006).

### 7.3.2.2 Sustratos orgánicos de variante con melaza

La reproducción realizada con melaza se observó de igual forma y constancia que la variante sin melaza, ya que a las 24 horas de igual forma no se observaba crecimiento a simple vista (**Figura 7.16**). A los 5 días pasados de inoculación del hongo y la melaza ya se presentaban rastros positivos de un crecimiento rápido en todas las bolsas de arroz, maíz (**Figura 7.16 inciso D**) y olote (**Figura 7.16 inciso E**) en todas las cepas, sin excepción, en comparación con la variante sin melaza, también se estresó el hongo con el cambio constante en la iluminación y agitación manual, cabe mencionar que la agitación manual se realizó después de los 7 días de inoculadas las muestras, debido a que los hongos tomaron más tiempo en cuanto a la adaptación de las nuevas condiciones de crecimiento. Ésta variante en particular se cosechó a los 15 días de haber sido inoculada (**Figura 7.16 inciso F**), no se realizó el mismo proceso de secado que en el anterior gracias a que la humedad que se tenía en las bolsas de sustrato era moderada, solo con la mezcla de gelatina simple con fécula de maíz fue suficiente para su cosecha, la razón de esto es que en el proceso descrito en la preparación y esterilización del sustrato orgánico (sección 6.3.5) tuvo una variación importante en el tiempo de remojo y el tiempo de secado, en la variante sin melaza se le dio solamente 15 minutos en comparación con la variante con melaza, donde los sustratos se remojaron por 45 minutos, tiempo suficiente para que el sustrato absorbiera toda la humedad que éste necesite, y posterior a esto con 13 horas de secado tuvo un tiempo prudente donde logró dejar fuera la humedad libre, a diferencia del tiempo de secado de apenas 5 horas en la variante sin melaza. La importancia de que no esté el sustrato húmedo, se debe a que en las zarandas que fueron cosechadas todas las cepas, se tiene una malla muy fina y se evita que queden partículas grandes del sustrato en el polvillo final de esporas.

## Desarrollo de un proceso de Producción de *Trichodermas*



**Figura 7. 16.** Crecimiento masivo de las esporas de los hongos en los sustratos con melaza. **A:** Inoculación de la melaza en el sustrato, **B:** Inoculación del hongo en el sustrato con melaza, **C:** Crecimiento a las 24 horas después de la inoculación, **D:** Crecimiento mayormente de micelio de los hongos a los 5 días después de la inoculación, **E:** Destrucción de las estructuras de los hongos (micelio) y **F:** Sustrato totalmente colonizado (Fuente propia).

Gómez, *et al.*, 2013, realizan un método de producción de *Trichoderma spp.*, dónde preparan agua destilada en bolsas de arroz con 2 gramos de urea por cada litro de agua. Las bolsas una vez inoculadas, son llevadas a la sala de germinación la cual tiene una temperatura entre los 24 y 27°C, incubándose en variaciones de luz y oscuridad. Las bolsas son agitadas suavemente para favorecer la oxigenación del sustrato y se dejaron de 5 a 8 días para completar su esporulación. Finalmente abren las bolsas en el centro para secar el sustrato y así bajar el contenido de humedad. La finalidad de la reproducción es de tener la solución directamente que se aplicará en el campo, por eso trabajan con agua destilada, hacen el conteo de las esporas luego de tener esa solución y lo aplican a los cultivos. Por otro lado, Pineda, *et al.*, 2017, realizó reproducción masiva de *Trichodermas* en diferentes sustratos orgánicos enriquecidos con melaza, demostrando que la humedad del sustrato juega un papel muy importante y por ende se reduce el tiempo de esporulación. En el presente trabajo se utilizan medios sólidos como el arroz los cuales son lavados pero no son sometidos a un crecimiento con altas cantidades de humedad, esto denota que el crecimiento en ellas sea más lento al querer esparcir sus micelios y/o esporas a lo largo de todo el sustrato contenido en las bolsas, sin embargo, una vez que el hongo se adapta las nuevas condiciones de crecimiento el proceso de esporulación es más rápido en comparación a la variante sin melaza, lo antes mencionado coincide con lo descrito por Pineda, *et al.*, 2017.

Es importante remarcar que en ambas variantes (sin y con melaza) la esporulación es esencial para la supervivencia de muchas especies de *Trichodermas* y por lo

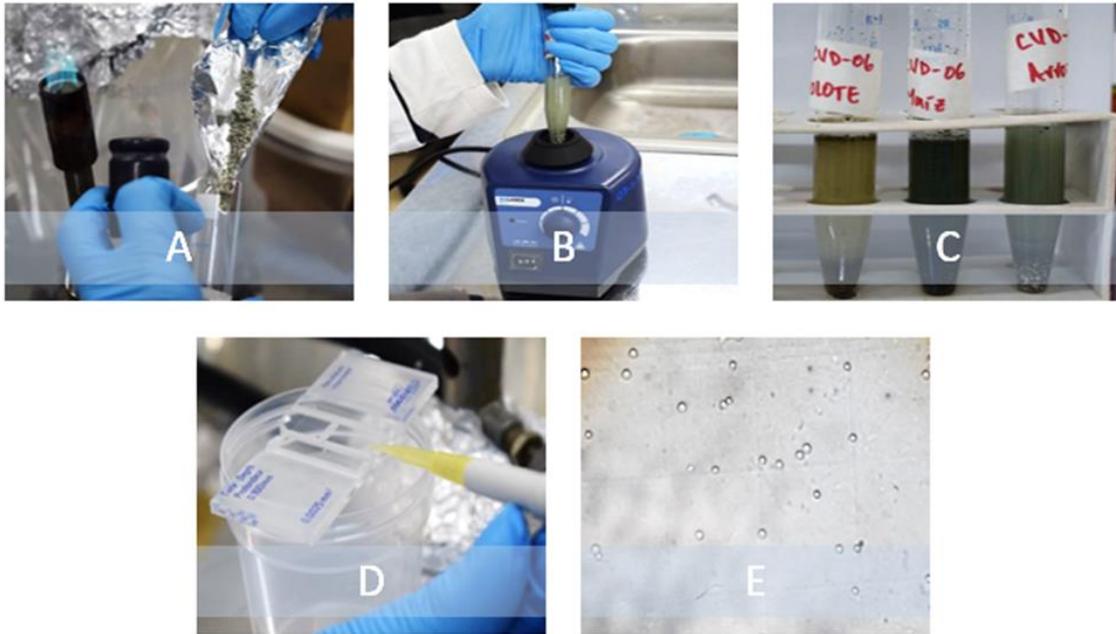
## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

tanto se podría esperar un alto grado de conservación en cómo funcionan los genes de esporulación y se regulan. Sin embargo, se ha demostrado que las respuestas de esporulación bajo las mismas condiciones controladas varían mucho entre especies. Puede ser que los genes mismos funcionen de la misma manera, pero las adaptaciones metabólicas específicas de la especie al ambiente alteran los umbrales de la respuesta y por lo tanto la respuesta de esporulación, enmascarando la semejanza en la regulación (Steyaert, *et al.*, 2013). Uno de los parámetros importantes para estimular la reproducción asexual y sexual en múltiples especies de hongos *Trichodermas* y de otras especies es la exposición a la luz, esto es debido a que en total oscuridad este género crece solamente como micelio, sin embargo, si se le aplica luz induce una cascada de respuesta que conduce a la esporulación del hongo (Horwitz, *et al.*, 1985), por otro lado Muñoz, 2012 reporta un mejor crecimiento de hongos o esporulación menor a 14 días con la estimulación de luz blanca con fotoperiodos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, también reporta que la luz constante puede llegar a inhibir la esporulación. En la presente investigación se aplicó estimulación para la esporulación por medio de luz blanca utilizando fotoperiodos de 8 horas luz y 16 horas de oscuridad, lo que pudo influir grandemente en el crecimiento de los hongos y por ende tomar más tiempo para colonizar totalmente el sustrato.

### **7.3.3 Cuantificación de esporas y evaluación de sustratos orgánicos**

Una vez alcanzado el tiempo necesario de crecimiento de los hongos *Trichodermas* en los diferentes sustratos y con las variantes correspondientes, se procedió a realizar la cosecha y cuantificación de esporas. Agamez, *et al.*, 2008; Vega y Hernández, 2020; Michel, *et al.*, 2008; Cruz, 2007, y Benites y Marroquín, 2015, utilizaron el método de conteo de esporas en Cámara de Neubauer, siendo éste el más sencillo de aplicar y se obtienen resultados confiables. En la presente investigación también se utilizó el mismo método (conteo de esporas en cámara de Neubauer), donde en la **Figura 7.17** se observa el proceso para la cuantificación. En cada investigación lo que varía es el modelo matemático utilizado para el conteo de esporas, esto es debido al tipo y marca de la cámara que se utilice. Los resultados obtenidos en este procedimiento se denotan en la **Tabla 7.9** donde se observan los valores diferenciados para cada especie de hongo *Trichoderma* y cada sustrato utilizado en esta investigación. En el **Anexo 15** se puede observar los cálculos a detalle que se realizaron en las variantes con y sin melaza.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*



**Figura 7. 17.** Cuantificación de esporas. **A:** Obtención de una pequeña muestra del hongo cosechado, **B:** Agitación de la muestra con la ayuda del vortex, **C:** Diluciones serias de la muestra del hongo en diferentes sustratos para facilitar el conteo de esporas, **D:** Colocación de la muestra del hongo en la Cámara de Neubauer, **E:** conteo de esporas en la cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio con el objetivo de 50x.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Tabla 7. 9.** Resultados de concentración de esporas en conidios/g en todos los *Trichodermas* de trabajo (Fuente propia).

Hongo	Sustrato	Sin melaza	Con melaza
		Concentración de Esporas	Concentración de Esporas
<b><i>Trichoderma harzianum</i> (72TG-11)</b>	Arroz	3.30*10 <sup>6</sup>	3.9*10 <sup>7</sup>
	Maíz	2.49*10 <sup>6</sup>	4.1*10 <sup>7</sup>
	Olote	1.74*10 <sup>6</sup>	9.3*10 <sup>6</sup>
	Copra de Coco	0	0
<b><i>Trichoderma longibrachiatum</i> (QIVD-12)</b>	Arroz	2.44*10 <sup>7</sup>	2.5*10 <sup>7</sup>
	Maíz	2.59*10 <sup>7</sup>	6.7*10 <sup>6</sup>
	Olote	0	2.16*10 <sup>7</sup>
	Copra de Coco	0	0
<b><i>Trichoderma sp.</i> (CIXD-11)</b>	Arroz	7.525*10 <sup>6</sup>	2.4*10 <sup>7</sup>
	Maíz	2.84*10 <sup>7</sup>	2.06*10 <sup>7</sup>
	Olote	6.00*10 <sup>6</sup>	1.35*10 <sup>7</sup>
	Copra de Coco	0	0
<b><i>Trichoderma harzianum</i> (T3)</b>	Arroz	1.03*10 <sup>8</sup>	1.37*10 <sup>8</sup>
	Maíz	1.29*10 <sup>7</sup>	8.1*10 <sup>7</sup>
	Olote	1.35*10 <sup>7</sup>	1.06*10 <sup>7</sup>
	Copra de Coco	0	0
<b><i>Trichoderma harzianum</i> (CVD-06)</b>	Arroz	9.20*10 <sup>7</sup>	8.7*10 <sup>7</sup>
	Maíz	3.70*10 <sup>7</sup>	5.7*10 <sup>7</sup>
	Olote	3.30*10 <sup>6</sup>	6.1*10 <sup>6</sup>
	Copra de Coco	0	0

De los sustratos orgánicos que se utilizaron en este trabajo, el arroz es el testigo en cuanto a resultados se refiere. Michel, *et al.*, 2008, realizó una reproducción masiva de *Trichoderma harzianum* en sustratos obteniendo con el arroz como sustrato 3.13x10<sup>4</sup> número de esporas por mL. Benites y Marroquín, 2015, obtuvieron un crecimiento en el arroz y en maíz en 6 días, al igual que obtuvieron concentraciones que variaban entre las 6.7x10<sup>6</sup> esporas/g hasta las 8.3x10<sup>8</sup> esporas/g, en este mismo trabajo presentaron problemas de crecimiento en el sustrato del olote de maíz. En la presente investigación, el crecimiento en el arroz fue completo en todas las bolsas que se inocularon, tanto en arroz sin melaza como en el arroz más melaza. Chavez, *et al.*, 2009, trabajaron el sustrato del arroz sumergido también con porcentajes de melaza y agua destilada, en distintos porcentajes cada uno, la fermentación sólida que realizaron dio un valor final de 52x10<sup>15</sup> conidios/g de arroz, y la variación de Arroz con melaza al 3% arrojó 23x10<sup>10</sup> conidios/mL. A continuación se puede observar el análisis del recuento de esporas presentados en la **Tabla 7.9**, el cual se asemeja a valores obtenidos en trabajos antes mencionados, como los

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

registrados por Benites y Marroquín, 2015, entre  $1 \times 10^6$  –  $1 \times 10^8$  concentración de esporas por gramo de relleno.

### 7.3.3.1 Evaluación de sustratos sin melaza

En la **Tabla 7.9** se tienen todos los valores de concentraciones de esporas diferenciados por sustrato y por cepa de *Trichoderma*, por lo que se procederá a separar el análisis por cepa de hongo. Para la cepa *Trichoderma harzianum* (72TG-11) con el sustrato arroz, se obtuvo  $3.30 \times 10^6$ , el maíz  $2.49 \times 10^6$  y el olote  $1.74 \times 10^6$ , por lo que no se tiene una gran variación por sustrato en el exponencial, por lo que el crecimiento y la reproducción del hongo en cuestión puede tomarse como similar o de igual resultado en todos los sustratos donde si hubo crecimiento. En el caso del *Trichoderma harzianum* (CVD-06) para el arroz se obtuvo una concentración de esporas de  $9.20 \times 10^7$ , el maíz de  $3.70 \times 10^7$  y en el caso del olote se obtuvo  $3.30 \times 10^6$  donde notablemente se tiene una disminución en el exponencial, lo cual indica que el arroz y el maíz se asemejan a mejores datos para la obtención de esporas y aplicación en el campo, sin embargo cabe mencionar que la variación es tolerable, esto quiere decir que la concentración de esporas con la reproducción en sustrato de olote sigue siendo útil. Para la tercera cepa de la misma especie *Trichoderma harzianum* (T3) se obtuvo el mayor valor registrado de concentración en el sustrato de arroz con  $1.03 \times 10^8$  esporas por gramo de relleno. Esto puede deberse a la cantidad de esporas que fueron inoculadas, ya que en la **Figura 7.11**, en la gráfica de crecimiento radial, se denotó que el mayor crecimiento en placa lo tiene el hongo T3, esto quiere decir que, como se le dió el mismo tiempo de crecimiento a todas las cepas, el hongo T3 creció más y por consecuente se inocularon más esporas. En el caso específico del *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12) para el arroz y el maíz se obtuvo  $2.44 \times 10^7$  y  $2.59 \times 10^7$  respectivamente, los cuales son valores similares en exponencial a los obtenidos por el *Trichoderma harzianum* (CVD-06), en el sustrato del olote de maíz triturado no se obtuvo crecimiento, esto se debió a factores que afectan directamente el crecimiento del hongo (humedad del sustrato, tiempo de secado del sustrato, etc.) y principalmente la especie de *Trichoderma* que se está trabajando. En el *Trichoderma sp.* (CIXD-11) para el arroz y el olote las concentraciones fueron similares en terminos de exponencial igualmente con  $7.52 \times 10^6$  y  $6 \times 10^6$  respectivamente. Para el maíz en cambio se tuvo una diferencia en tener mayor concentración de esporas con  $2.84 \times 10^7$  esporas por gramo de relleno. De todos los valores antes mencionados, el que represento un cambio notable con mayor exponencial fue la producción de arroz sin melaza del *Trichoderma harzianum* (T3).

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

### 7.3.3.2 Evaluación de sustratos con melaza

Para los sustratos arroz, olote de maíz, copra de coco y maíz triturado se les adicionó melaza al 5%, los resultados de este crecimiento fueron los siguientes. Para la cepa *Trichoderma harzianum* (72TG-11) se obtuvo para el arroz  $3.9 \times 10^7$  donde el arroz sin melaza dio un resultado menor con  $3.30 \times 10^6$  obteniéndose el primer resultado satisfactorio en la adición de melaza; para el maíz, con melaza se obtuvo  $4.1 \times 10^7$  donde en cambio sin melaza resultó de  $2.49 \times 10^6$  obteniéndose la misma variación de aumento en el exponencial que en la producción de arroz; finalmente, para el olote de maíz se obtiene  $9.3 \times 10^6$  cuando sin melaza resultó de  $1.74 \times 10^6$  esporas por gramo de relleno; notablemente para todos los sustratos en el caso de esta cepa, la adición de melaza realiza un cambio favorable en cuanto a la obtención de esporas. Para la cepa *Trichoderma harzianum* (CVD-06) en el arroz se obtuvo  $8.7 \times 10^7$  con melaza, y sin melaza fue de  $9.20 \times 10^7$ , no hay diferencia notable en el exponencial por lo que se puede concluir que no afectó el uso de melaza para el arroz en esta cepa, en el caso del maíz se concluye del mismo modo ya que se obtuvieron valores de  $5.7 \times 10^7$  con melaza y  $3.70 \times 10^7$  sin melaza. En cuanto al olote sucede lo mismo que con el arroz y el maíz, donde se observa el mismo exponencial en cuanto a las esporas de la cepa CVD-06 por lo que finalmente se deduce que para la cepa *Trichoderma harzianum* CVD-06 no hay cambio en el crecimiento con la adición de melaza. En el caso de la cepa *Trichoderma harzianum* (T3) con el sustrato de arroz se obtuvo  $1.37 \times 10^8$  el cual sigue siendo similar al resultado arrojado por el crecimiento de arroz sin melaza, lo que señala que en efecto, la reproducción del T3 es superior a todas las otras cepas de *Trichodermas* y así mismo es en la reproducción de sustratos; el en caso del maíz con melaza se tiene  $8.1 \times 10^7$ , donde sin melaza resultó de  $1.29 \times 10^7$ , también se observa un crecimiento mayor en cuanto a la adición de la melaza; finalmente para el olote de maíz se tuvo que con melaza resultó de  $1.06 \times 10^7$  y sin melaza  $1.35 \times 10^7$  viéndose así que es el único sustrato que no refleja diferencia en el crecimiento de la cepa con melaza.

Para el hongo *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12) en el arroz con melaza se obtuvo  $2.5 \times 10^7$  y sin melaza fue de  $2.44 \times 10^7$ , valores muy similares en cuanto a la reproducción del hongo; el maíz paso de  $2.59 \times 10^7$  sin melaza a  $6.7 \times 10^6$  con melaza, donde señala un cambio en la disminución del exponente en cuanto a su reproducción con melaza, lo que concluye que la adición de la melaza para el sustrato del maíz no es recomendable. Finalmente, la diferencia relevante entre los resultados en esta variante es que si hubo crecimiento de sustrato de olote con el hongo *T. longibrachiatum* (QIVD-12) con  $2.16 \times 10^7$  esporas por gramo de relleno. En el caso de la cepa *Trichoderma sp.* (CIXD-11) para el arroz y el olote se tiene una variación benéfica donde aumenta el exponencial en ambos casos para el crecimiento con melaza en comparación de sin melaza, con  $2.4 \times 10^7$  para el arroz en comparación a  $7.52 \times 10^6$  y  $1.35 \times 10^7$  en el olote con melaza en comparación a

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

$6 \times 10^6$  sin melaza. Para el maíz específicamente se mantiene igual con  $1.29 \times 10^7$  sin melaza y  $2.06 \times 10^7$  con melaza. Chiriboga, *et. al.*, 2015, reporta que para efectos prácticos de llevar soluciones de esporas de hongos *Trichodermas* al campo lo importante recae en el exponencial de la concentración de esporas, siendo la indicada valores mayores a  $1 \times 10^4$ . Dicho esto, las concentraciones de esporas obtenidas en los diferentes sustratos y con ambas variantes están dentro del rango establecido para su aplicación al campo, por otro lado, con base en los resultados obtenidos anteriormente se denota que la melaza tiene una gran variación en cuanto al exponente en las concentraciones de esporas lo cual indica que el uso de esta puede influir en obtener mejores concentraciones para una mayor escala. También se debe a que la melaza influye en el tiempo de crecimiento y desarrollo de los hongos, ya que en esta variante de inoculación la cosecha de esporas se realizó a los 15 días y en la variante sin melaza se realizó a los 26 días. Es importante recalcar que el trabajar sin melaza reduce grandemente el riesgo de una contaminación al momento de la reproducción masiva de los hongos, ya que es un sustrato en el cual crecen una amplia variedad de microorganismos por lo que la utilización de este requiere de mayor cuidado y un trabajo previo a dicha melaza antes de ser inoculada en los sustratos de reproducción.

Finalmente, la importancia de la comparación en reproducción masiva de *Trichodermas*, recae en encontrar un sustrato que no sea competencia con el alimento de consumo humano como lo es el arroz y el maíz. Con los resultados obtenidos anteriormente se concluye que el arroz es, en sí, el mejor sustrato para reproducción de esporas de *Trichodermas* a como ya ha sido reflejado en bibliografías antes mencionadas, de igual forma la mejor cepa de reproducción es el *Trichoderma harzianum* T3, el cual crece en grandes cantidades para todos los sustratos. Sin embargo, el olote de maíz por su parte es un desecho propiamente de la cosecha de maíz, y en términos de concentración de esporas y exponencial, se obtienen resultados satisfactorios en cuanto a la reproducción de hongos *Trichodermas*, por lo que se concluye que el sustrato mayormente recomendado para llevar a cabo la reproducción masiva a escala de laboratorio y posiblemente en niveles muy grandes de producción es el olote de maíz triturado.

### 7.3.4 Dosificación de esporas

En la dosificación de esporas de los hongos *Trichodermas* se registra según el Proyecto MUSA de la Unión Europea en 2019, donde explica la forma de aplicación al producto a base del hongo *Trichoderma*, en el cual para tratar 100 kg de semilla, se debe usar 1kg de producto a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas por gramo de producto. Por otro lado, Chiriboga, *et. al.*, 2015, trabajan con una suspensión de esporas de *Trichodermas* de  $1 \times 10^8$  esporas por mL. La dosis que recomiendan es de 1 L (litro) de suspensión por cada 19 litros de agua. El agua debe ser limpia y libre de desinfectantes, el equipo de rocío debe estar limpio de residuos de fungicidas. Con solo 4 litros de la solución, se puede llegar a cubrir específicamente

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

una hectárea de frutilla. Es importante mencionar que dichos autores hacen recomendaciones sobre la dosificación para la aplicación a cultivos, sin embargo no son recetas a tomar, por lo que es necesario mantener todos los cálculos de las concentraciones de esporas a trabajar y así poder definir cuantas esporas obtendrán por una determinada cantidad de agua a aplicar a los cultivos.

## VIII. CONCLUSIONES

Al finalizar este trabajo, habiendo cumplido con los objetivos propuestos, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Como un plus del presente trabajo, se logró aislar y caracterizar 7 bacterias y 29 hongos filamentosos, las cuales pasaron a enriquecer la base de microorganismos aislados de los que dispone el PIENSA.
- Se identificó morfológica y molecularmente 1 *Trichoderma harzianum* (72TG-11) y 2 *Penicillium oxalicum* (20TG-01 y 51TG-15), provenientes de Terrabona, Matagalpa.
- Por medio de la reproducción masiva realizada a las mismas condiciones para las cepas de *Trichoderma* y los distintos sustratos (arroz como testigo, copra de coco, maíz y olote de maíz) se determinó que el olote de maíz arroja valores muy cercanos a los del arroz,.
- Para el hongo *Trichoderma harzianum* 72TG-11 donde se obtiene (sin melaza) el valor de  $3.30 \times 10^6$  en arroz y  $1.74 \times 10^6$  en olote; el exponencial no varía por lo que denota que el olote es un sustrato ideal para la reproducción de los hongos sin tener que utilizar alimento del ser humano (como en el caso del arroz).
- En cuanto al uso de la melaza, el *Trichoderma harzianum* (72TG-11), mostraron estimulación en su producción de esporas ante arroz y maíz triturado, e inclusive ante olote de maíz pasando de  $10^6$  sin melaza a  $10^7$  con melaza. *Trichoderma sp.* (CIXD-11), mostró resultados similares al anterior para todos los sustratos evaluados.
- Para los hongos *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12), *Trichoderma harzianum* (T3) y *Trichoderma harzianum* (CVD-06), aparentemente la adición de melaza no mostró diferencias apreciables en cuanto al número de esporas.
- En el sustrato de copra de coco triturada no se obtuvo crecimiento porque la copra de coco tanto en melaza, como sin melaza no aporta los suficientes nutrientes para el desarrollo de cepas *Trichodermas*.

IX. RECOMENDACIONES

1. Es recomendable que para la realización de identificación molecular y la obtención de datos satisfactorios se trabaje con una misma empresa o en un mismo laboratorio donde preste los servicios necesarios para esta.
2. Se recomienda trabajar en el diseño y montaje de un cuarto especializado para la reproducción masiva de hongos *Trichodermas*.
3. Para la utilización del sustrato orgánico copra de coco triturada, para lograr la reproducción de cepas *Trichodermas*, se adicione el uso de materia orgánica propiamente tales como: heces, almidón, etc.
4. Para el desarrollo de la reproducción masiva de aislados *Trichodermas* es necesario que primero se estudie y comprenda el crecimiento de cada cepa de *Trichoderma* en placa, antes de pasarlos a reproducción en cualquier otro sustrato.

X. BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, D., Granados, C. y Guerrero, E. (2014). Cinética Enzimática del Bagazo de Caña para la Producción de Glucosa Utilizando la Enzima *Trichoderma longibrachiatum*. *Información tecnológica*, 25(5), 65-72. doi: 10.4067/S0718-07642014000500010
- Acuña, J. (2015). Caracterización por método fenotípicos y genéticos de una cepa de *Rhodococcus* aislada de una red de distribución de agua (Tesis doctoral). Universidad Católica de Murcia, España
- Acurio, D y España, C. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma spp.* como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de Raygrass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 25(1), 53-61. doi: 10.17163/lgr.n25.2017.05
- Agamez, E., Zapata, R., Oviedo, L. y Barrera, J. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp.* *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 23–34. ISSN: 1909-8758
- Alejos, L., Aragón, M y Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Revista Torreón Universitario*, 24(1), 45-57. ISSN: 2410-5708
- Álvarez, X. (2011). *Aislamiento e identificación de hongos marinos del manglar de Palmar-Provincia de Santa Elena, y establecimiento del banco de cepas fúngicas* (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador
- Arias, E., y Piñeros, P. (2008). *aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramos de Guasca y Cruz verde* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia
- Ávila, M., Herrera, A. & Peña, J. (2006). Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic by strains of *Trichoderma Harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. *Soil Biology & Biochemistry*, 38(7), 1823-1830. doi: 10.1016/j.soilbio.2005.11.036
- Bader, A., Salerno, G., Covacevich, F. y Consolo, F. (2020). Bioformulación de *Trichoderma harzianum* en sustrato sólido y efectos de su aplicación sobre plantas de pimiento. *Revista De La Facultad De Agronomía*, 119(1), 1-9. doi:10.24215/16699513e037
- Baudalf, S. (2003). Phylogeny for the faint of heart: A tutorial. *Trends in Genetics*, 19(6), 345-351. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00112-4
- Benites, C. y Marroquín, L. (2015). Producción de *Trichoderma harzianum* en diferentes sustratos orgánicos. *Portal De La Ciencia*, 4(1), 68-74. doi:

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

10.5377/pc.v4i0.1864

- Benson, D., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch, I., Ostell, J., Pruitt, K. & Sayers, E. (2015). GenBank. *Nucleic Acid Research*, 46(1), 41-47. doi: 10.1093/nar/gkx1094
- Beorlegui, C. de B. (2003). *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos*. Recuperado de [https://books.google.com.ni/books/about/Tablas\\_FEDNA\\_de\\_composición\\_y\\_valor\\_nut.html?id=jKNsAAAACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ni/books/about/Tablas_FEDNA_de_composición_y_valor_nut.html?id=jKNsAAAACAAJ&redir_esc=y)
- Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissig, H., Shindyalov, I. & Bourne, P. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Research*, 28(1), 235-242. doi: 10.1093 / nar / 28.1.235
- Betina, V. (1995). Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Folia Microbiología*, 40(1), 219-224. doi: 10.1007/BF02814196
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma* III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany*, 69(11), 2373-2417. doi: 10.1139/b91-298
- Brian, P. (1944). Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*. *Nature*, 154(1), 667-668. doi: 10.1038/154667b0
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J. y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012
- Buchert, J., Ranua, M., Siika-aho, M., Pere, J & Viikari, J. (1994). *Trichoderma reesei* cellulases in bleaching of kraft pulp. *Microbiology Biotechnology*, 40(6), 941-945. doi: 10.1007/BF00174003
- Castillo, D. (2020). Determinación de la variabilidad genética de *Trichoderma* nativo de Nicaragua mediante el uso de rep-PCR y su potencial *in vitro* como antagonista de *Fusarium* spp. Laboratorio de Agrobiotecnología, INTA-CNIA. 2018-2020 (Tesis de grado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua
- Castillo, F., Hernández, F., Gallegos, G., Flores, A., Rodríguez, R. y Aguilar, C. (2015). Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(3), 549-562. doi: 10.29312/remexca.v6i3.638
- Camero, J., y Linares, F. (2013). *Implementación de un protocolo para la conservación de hongos filamentosos con potencial biotecnológico de la colección del laboratorio de química microbiológica de la Pontificia Universidad Javeriana* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana,

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

Colombia

- Campos, M. (2009). *Efecto de la inoculación de sustratos con Trichoderma spp. sobre el crecimiento y producción de plantas de chile dulce (Capsicum annuum) Linn, bajo ambiente protegido* (Tesis de grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica
- Cárdenas, A. (2012). Evaluación de la eficiencia como preservantes antifúngico del borato de zinc y su efecto en las propiedades físicas y mecánicas de materiales compuestos de plástico y madera de pino (Tesis de grado). Universidad de Guadalajara, México
- Castro, A. y Rivillas, C. (2012). Trichoderma spp. Modo de acción, eficacia y usos en el cultivo de café. *Cenicafé*, 53(9), 1-33. ISSN: 1098-6596
- Chahal, D. S. (1985). Solid-state fermentation with Trichoderma reesei for cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 205–210. doi:10.1128/aem.49.1.205-210.1985
- Chavarría, M. (2016). *Evaluación de aislados nativos de Trichoderma spp para el manejo de hongos causantes de mal del talluelo en tomate (Solanum lycopersicom L.)* (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua
- Chávez, J., Torres, C., Espinoza, E., Zambrano, D., Villafuerte, A., Zambrano, F. y Velázquez, J. (2020). EFECTOS DE LA CEPA NATIVA DE Trichoderma sp. Y LIXIVIADO DE VERMICOMPOST BOVINO SOBRE EL CRECIMIENTO FOLIAR Y CONTENIDO DE CLOROFILA EN ARROZ (Oryza sativa L.) EN FASE DE SEMILLERO. *Ecuador es Calidad*, 7(2), 23-31. doi: 10.36331/revista.v7i2.104
- Chavez, M. (2006). *Produccion de Trichoderma sp y evaluacion de su efecto en cultivo de crisantemo* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia
- Chavez, M., Montaña, J., Chavez, M., Martínez, M., Mercado, M., Rodríguez, M. y Quevedo, B. (2009). Efecto del sustrato y la exposicion a la luz en la producción de una cepa Trichoderma spp. *Universitas Scientiarum*, 13(3), 245-251. ISSN: 0122-7483
- Chiriboga, H., Gómez, G. y Garcés, K. (2015). TRICHODERMA SPP. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES. Paraguay: IICA. Recuperado de: <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2647/BVE17038725e.pdf;jsessionid=FAE20E917A88F674C3FCEC4837B98B67?sequence=1>
- CIMMYT. (1995). *Manejo de los ensayos e informe de los datos para el Programa de Ensayos Internacionales de Maíz del CIMMYT*. ISBN: 970-648-045-5

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Companioni, B., Domínguez, G. y García, R. (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal*, 19(4), 237-248. ISSN 2074-8647
- Córdoba, J., Salcedo, E., Rodríguez, R., Zamora, J., Manríquez, R., Contreras, H., Robledo, J. y Delgado, E. (2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Revista Latinoamericana de Química*, 41(3), 171–184. ISSN: 0370-5943
- Cruz, L. (2007). *Estandarización del proceso de producción masiva del hongo trichoderma koningii mediante fermentación bifásica a escala piloto* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y Caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia
- Da Fonseca, V. (1998). *Manual de observación Psicomotriz*. Barcelona, España: INDE. (1ra ed.), Cap. III, pp. 125-190. ISBN: 84-87330-78-9
- Daugovish, O., Smith, R., Cahn, M., Koike, S., Smith, H., Aguiar, J., Quiros, C., Cantwell, M. & Takele, E. (2008). Celery production in California. *Division of Agriculture and Natural Resources*, 72(20), 1-4. Doi: 10.3733 / ucanr.7220
- Delgado, H. y Fonseca, E. (2019). *Bioprospección microbiana dirigida a identificar microbiológica y molecularmente microorganismos de utilidad agrícola e industrial en Nicaragua* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua
- Di Pietro, A., Lorito, M., Hayes, C., Broadway, R & Harman, G. (1992). Endochitinase from *Gliocladium irens*: Isolation, Characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopatology*, 83(3), 308-313. ISSN: 0031-949X
- Doelle, H., Mitchell, D., & Rolz, C. (1992). *Solid substrate cultivation*. Dordrecht, Holandal: Springer Países Bajos. (1ra Ed.), Cap. I, pp. 10. ISBN: 978-1-85166-879-3
- Domsch, K., Gams, W. & Anderson, T. (2008). Compendium of soil fungi. *European Journal of Soil Science*, 59(1), 1000-1011. doi: 10.1111/j.1365-2389.2008.01052\_1.x
- Doner, L & Hicks, K. (1997). Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. *Cereal Chemistry*, 74(2), 176-181. doi: 10.1094/CCHEM.1997.74.2.176

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Druzhinina, I., Kopchinskiy, C & Kubicek, C. (2006). The first 100 Trichoderma species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47(2), 55-64. doi: 10.1007/S10267-006-0279-7
- Druzhinina, I & Kubicek, C. (2005). Species concepts and biodiversity in Trichoderma and Hypocrea: From aggregate species to species clusters. *J Zhejiang Univ Sci B*, 6(2), 100-112. doi:10.1631/jzus.2005.B0100
- Echeverría, F. (2006). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana (Bálsamo) Vuillemin* (Tesis de grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica
- Fernandez, A., García, C., Sáez, J y Valdezate, S. (2010). Evaluación de métodos de extracción de ADN bacteriano en muestras fecales de pacientes diagnosticados con infección por Helicobacter pylori. *Biociencias*, 13(2), 1-18. doi: 10.18041/2390-0812/biociencias24996
- Flores, M. y Roque, E. (2017). *Aislamiento y Caracterización microbiana (microbiológica y molecular) en la búsqueda de Bacillus subtilis a partir de bioinsumos comerciales y pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua
- Forbes, B., Sahm, D y Weissfeld, A. (2007). *Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. (12th. Ed.), Cap. 7-11, pp. 93-186. ISBN:978-950-06-8243-5
- French, E., y Hebert, T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Cap. II, pp. 21-32. ISBN: 9290390247
- Gaitán, I. y García, E. (1998). *Prueba a nivel de campo y escalado a planta piloto del proceso de producción de biofertilizante* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua
- Galante, Y., Monteverdi, R., Inama, S., Caldini, C., De Conti, A. & Avelli, V. (1993). New applications of enzymes in wine making and olive oil production. *Food technology and Biotechnology*, 56(1), 16-30. doi: 10.17113/ftb.56.01.18.5491
- Gams, W & Brisset, J. (1998). *Morphology and identification of Trichoderma*. London: Tyler and Francis, Chapter 1, 32-54. ISBN: 8546-9472
- García, R., Durán, M. y Riera, R. (2006). Producción de biomasa de *Trichoderma harzianum* por fermentación líquida. *Fitosanidad*, 10(4), 295-298. ISSN: 1562-3009
- González, T., Moreno, L., Troncoso, R., González, D., Sánchez, A., Grimaldo, O., Tzinzun, O. y Ceceña, C. (2017). Inoculación de Trichoderma

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- longibrachiatum en algodón transgénico: Cambios en compuestos fenólicos y enzimas de estrés oxidativo. *Idesia (Arica)*, 35(1), 19-24. doi: 10.4067/S0718-34292017005000005
- Gómez, H., Soberanis, W., Tenorio, M., y Torres, E. (2013). *Manual de Producción y Uso de Hongos Antagonistas*. Recuperado de <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Antagonistas.pdf>
- Gómez, P. y Mendoza, J. (2004). Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. *Centro de Investigación de La Caña de Azúcar Del Ecuador*, 5(1), 1-13. doi: 10.1007/s10295-010-0865-8
- Gómez, R., Roussos, S., Medina, M., Farruggia, B., Pico, G. y Aguilar, C. (2019). Producción de Enzimas de *Trichoderma harzianum* por Fermentación de Residuos Lignocelulósicos. *Journal of BioProcess and Chemical Technology*, 13(22), 525-534. doi: 10.1002/bit.260350808
- Gómez, T. (2017). Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de *Trichoderma* spp mediante fermentación en líquido y sólido (Tesis de grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica
- González, F. (2018). *Utilización de abonos verdes Canavalia, como alternativa de manejo ecológico del suelo para el establecimiento de un banco de semilla de maíz criollo (Zea mays L.) en la comunidad del Caño Central municipio de El Cuá, Jinotega* (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua
- Grewal, H. & Kalra, K. (1995). Fungal production of citric acid. *Journal of Biotechnology Advances*, 13(2), 209-234. doi:10.1016/0734-9750(95)00002-8
- Guigón, C., Guerrero, V., Vargas, F., Carvajal, E., Ávila, G., Bravo, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. y Lorito, M. (2010). Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* sp. su Tasa de Crecimiento in vitro y Antagonismo contra Hongos Fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 87-96. ISSN 2007-8080
- Harman, G. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma Harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84(4), 377-393. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.4.377
- Harman, G (2001). *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other sp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). *Plant Disease*, 5(5), 495-504. ISSN: 0191-2917

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Harman, G., Chet, I. & Baker, R. (1981). *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp.. *Microbial Ecology*, 7(1), 29-38. doi: 10.1007/BF02010476
- Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I and Lorito M. (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56. doi: 10.1038/nrmicro797
- Hawksworth, D. (1991). The fungal dimension of biodiversity, magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641–655. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80810-1
- Hawksworth, D. & Rossman, A. (1997). Where are all the undescribed fungi?. *Phytopathology*, 87(9), 888–891. doi: 10.1094 / PHYTO.1997.87.9.888
- Hernández, D., Ferrera, R. y Alarcón, A. (2019). *TRICHODERMA*: SISTEMAS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35 (1), 98-112. doi: 10.4067/S0719-38902019005000205
- Hernández, D. y Loaiza, S. (2014). Selección de un método para la conservación y preservación de Actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (Tesis de grado). Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia
- Hernández, J., Sánchez, M., García, J., Mayek, N. y González, J. (2011). Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* spp. de diferentes ecosistemas en la región del Papaloapan. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 176-185. ISSN 0123-3475
- Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuiper, M & Vos, P. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 07-14. doi: 10.1093/nar/23.21.4407
- Horwitz, B., Perlman, A. & Gressel, J. (1990). Induction of *Trichoderma* sporulation by nanosecond laser pulses: Evidence against cryptochrome cycling. *Photochemistry and Photobiology*, 51(1), 99-104. doi: 10.1111/j.1751-1097.1990.tb01689.x
- Infante, D., Martínez, B., González, N and Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. ISSN 1010-2752

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Jackson, A., Whipps, J & Lynch, J. (1991). Effects of temperature, pH and water potential on growth of fur fungi with disease biocontrol potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 494-501. doi: BF00303376
- Jaklitsch, W. & Voglmayr, H. (2006). Biodiversity of Trichoderma (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology*, 80(1), 1-87. doi: 10.3114/sim.2006.56.04
- Jaklitsch, W., Samuels, G., Dodd, S., Bing-Sheng, L & Druzhinina, I. (2006). *Hypocrea rufa*/Trichoderma Viride: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology*, 56(1), 135-177. doi: 10.1016/j.simyco.2014.11.001
- Kliefeld, O & Chet, I. (1992). Trichoderma Harzianum interaction with plants and effect on growth response. *Plant and soil*, 144(2), 267-272. doi: 10.1007/BF00012884
- Knob, A & Cano, E. (2010). Purification and characterization of two extracellular xylanases from Penicillium sclerotiorum: a novel Acidophilic xylanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 429-443. doi: 10.1007/s12010-009-8731-8
- Kovacs, K., Szakacs, G., Pusztahelyi, T. & Pandey, A. (2004). Production of Chitinolytic Enzymes With *Trichoderma longibrachiatum* IMI 92027 in Solid Substrate Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1), 189-204 doi: 10.1385/ABAB:118:1-3:189
- Kubicek, C & Harman, G. (1998). *Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics*. Londres: Taylor & Francis. (1ra. Ed.), Cap. I y II, pp. 3 y 35. ISSN: 784-0572
- Kulhs, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G., Meyer, W., Kubicek, C and Borner, T. (1997). Revision of Trichoderma Sect. Logibrachatum including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycology*, 89(3), pp.442-460. doi: 10.1080/00275514.1997.12026803
- Lacy, M., Berger, R., Gilbertson, R. & Little, E. (1996). Current challenges in controlling diseases of celery. *Plant Disease*, 80(10), 1084-1091. Doi: 10.1094/PD-80-1084
- Lesniak, W. (1999). Fermentation Substrates. *Citric acid Biotechnology*, 24(1), 1065-1067. doi: 10.1023/A:1016030513270
- Lieckfeldt, E., Samuels, G., Nirenberg, H & Petrini, O. (1999). A morphological and molecular perspective of Trichoderma viride: Is it one or two species. *Environmental Microbiology*, 65(6), 418-428. doi: 10347022
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Serón, G. y Franco, R. (2014). Las

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad Medigraphic*, 3(1), 10-18. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.138
- López, R. (2011). *Detección y cuantificación de Trichoderma harzianum, y evaluación de su actividad biocontrol frente a fusariosis vascular del melón mediante la aplicación de herramientas moleculares* (Tesis doctoral). Universidad de Alicante, España
- Lynch, J., Wilson, K., Ousley, M & Whipps, J. (1991). Response of lettuce to Trichoderma treatment. *Micriobology*, 12(2), 59-61. doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00503.x
- Madigan, M., Martinko, J y Parker, J. (2009). *Brock: Biología de los Microorganismos*. Madrid, España: PEARSON EDUCACIÓN, S.A. (12th Ed.), Cap. IV, pp. 18-25. ISBN: 9788490352793
- Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). Trichoderma sp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. ISSN: 1010-2752
- Marwi, D. (2013). Identificación de cepas del hongo Trichoderma spp. Por métodos moleculares. *Revista Faraute de Ciencia y Tecnología*, 8(2), 5-9. ISSN: 1698-7418
- Mas, S., Lobaina, E., Rodríguez, I., Tejera, H. y Núñez, E. (2019). Modelación de la formación de biomasa de *Trichoderma harzianum rifai* (A-34) en fase sólida. *Tecnología Química*, 39(2), 444-454. ISSN 2224-6185
- Mau, S., Vega, K. y Araya, M. (2011). Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales. *Revista de Ciencias Ambientales (Tropical Journal of Environmental Sciences)*, 42(2), 45-52. doi: 10.15359/rca.42-2.4
- Medina, S. (2016). *MECANISMOS DE PROTECCIÓN DE Trichoderma sp. Y PATOGENESIS DE Fusarium oxysporum EN EL NARDO (Polianthes tuberosa)*. (Tesis de maestría). CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A. C, México
- Meneses, C., Rozo, L. y Franco, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et technica*, 3(49), 1-6. doi: 10.22517/23447214.1491
- Mesa, A., Marin, A. y Calle, J. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma sp.* y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 32-44. doi: 10.17533/udea.acbi.v41n111a02

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Michel, A., Otero, M., Martínez, R., Rodríguez, N., Ariza, R., y Barrios, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Chapingo serie Horticultura*, 14(2), 185-191. ISSN 2007-4034
- Michel, A., Otero, M., Solano, L., Ariza, R., Barrios, A. y Rebolledo, A. (2009). Biocontrol in vitro con *Trichoderma* sp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la "Escoba de Bruja" del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista mexicana de fitopatología*, 27(1), 18-26. ISSN 2007-8080
- Michielse, C; Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311-324. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x
- Montaño, N., Sandoval, A., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). Los microorganismos: Pequeños gigantes. *Elementos: Ciencia y cultura*, 17(77), 15-23. ISSN: 0187-9073
- Moore, E. (1996). Fundamentals of the fungi. Bogotá, Colombia: Benjamin Cummings. (4th. Ed), Cap. 10, pp. 326-333. ISBN: 9780133392678
- Mora, S., Gavi, F., Peña, J., Pérez, J., Tijerina, L., y Vaquera, H. (2007). Desnitrificación de un fertilizante de lenta liberación y urea+fósforo monoamónico aplicados a trigo irrigado con agua residual o de pozo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(1), 25-33. ISSN: 01884999
- Moreno, J., y Albarracín, V. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología, 5(5), 79-93. ISSN: 1989-3620
- Moya, J., García, S., Avilés, E., Andújar, F., y Núñez, P. (2014). Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana. *Revista APF*, 3(2), 11-16. ISSN: 2224-4697
- Muñoz, T. (2012). Obtención del epigenoma de *Trichoderma atroviride* en respuesta a la luz azul (Tesis de Maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, México
- Musa (Unión Europea). (2019). *Trichoderma asperellum* como agente de control biológico para el manejo de plagas. (1st. Ed.), pp. 1-4. Recuperado de: <http://www.projectmusa.eu/wp/wp-content/uploads/2019/05/Manual-Trichoderma-MUSA-Arreglado.pdf>
- Nampoothiri, K. M., Baiju, T. V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 39(11), 1583-1590. doi:10.1016/S0032-9592(03)00282-6

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Osuna, F., Moreno, M., García, F., Ramírez, S. y Canul, J. (2012). Biocontrol de la pudrición de raíz de nochebuena de interior con *Trichoderma* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 553-564. doi: 10.29312/remexca.v3i3.1449
- Otalora, A., Martínez, M., y Pedroza, A. (2001). *Evaluación de medios de cultivo alternos para la producción de Trichoderma harzianum* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- Paramo, L. (2012). *Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural* (Tesis doctoral). Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamaulipas
- Páramo, L., Narváez, Z. y De la Cruz, E. (2011). Aislamiento e identificación de microorganismos en biopelículas provenientes del castillo de Chapultepec, Ciudad de México. *Revista científica NEXO*, 24(2), 83-91. doi: 10.5377/nexo.v24i2.656
- Papavizas, G. (1985). *Trichoderma & Gliocladium: Biology, ecology and potential for biocontrol*. *Phytopathology*, 23(1), 23-54. doi: 10.1146/annurev.py.23.090185.000323.
- Pelzcar, M. (1997). *Microbiología, conceitos e aplicações*. Portugal: Pearson Universities. (1ra. Ed.), Cap. III, pp. 33-50. ISBN: 8534601968
- Pérez, N., Torrado, A., López, C. & Pastrana, L. (2003). MAIN CHARACTERISTICS AND APPLICATIONS OF SOLID SUBSTRATE FERMENTATION. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(3), 343–350. ISSN: 1579-4377
- Pineda, J., Benavides, E., Duarte, A., Burgos, C., Soto, C., Pineda, C., Fierro, F., Mora, E. y Álvarez, S. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(1), 47-52. ISSN: 0138-6204
- Pinzón, Y., Bustamante, S., Rodríguez, P., y Buitrago, G. (2013). Diagnóstico molecular diferencial de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 52-60. ISSN 0123-3475
- Prescott, S & Dunn's, A. (1987). *Industrial Microbiology*. Madrid, España: McGraw Hill. Cap. V, pp. 94-97. ISBN: 9788123910017
- Prescott, L., Harley, J. & Klein, D. (2002). Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Produce. *Journal of Food Protection*, 59(2), 204-216. ISSN: 30223-1797
- Rahardjo, Y. (2001). *Fungal Mats in Solid-State Fermentation* (Tesis doctoral).

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

Wageningen University, Netherlands

- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 114–140. ISSN: 0717-3458
- Ramírez, N. (2006). Efecto de la aplicación de Pencycuron y Pro-selective para el control de *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. en el cultivo de melón y calabaza en parcelas de monitoreo de alternativas al Bromuro de Metilo, en la finca Los Yajes, Estanzuela, Zacapa (Tesis de grado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala
- Ramos, E., Navarro, R., Zumaqué, L. y Violeth, J. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 23-34. ISSN: 0123-3475
- Reese, E & Manels, M. (1989). Rolling with the times: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. *Annual Reports of fermentation processes*, 7(1), 1-20. doi: 10.1016/B978-0-12-040307-3.50006-8
- Rincón, J., Rincón, P., Torres, E., Mondragón, A., Sánchez, M., Arana, A., Ortiz, A. y Jiménez, E. (2016). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE LA FIBRA DE MESOCARPIO DE COCO (*Cocos nucifera* L.). *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 279–284. doi: 10.25054/22161325.1914
- Ríos, C. (2019). Bioprospección microbiana para el desarrollo de aplicaciones ambientales (Tesis de grado). Universidad Nacional de Ingeniería, Managua, Nicaragua
- Rodicio, M. y Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, 22(4), 238-245. doi: 10.1157/13059055
- Rodríguez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en Tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad santa clara, aislados de residuos Ligno celulósicos de Higuierilla (*Ricinus communis*)* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Católica de Manizales, Colombia
- Rojas, A. (2011). *Conceptos y Práctica de Microbiología General*. Universidad Nacional de Colombia
- Rojas, A., Cox, G., Burgos, N., Morey, G. y Wilson, J. (2017). Aislamiento, selección e identificación de especies nativas de *Trichoderma* spp. con efecto biocontrolador sobre nematodos noduladores que afectan al cultivo de

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Asparagus officinalis de la empresa Agroindustrial Camposol S.A. *Véritas Journal*, 15(1), 1-11. ISSN 2617-8818
- Rosas, S. (2015). Determinación de microorganismos presentes en colorantes naturales-dactylopius cocus (cochinilla) empleados en la industria de alimentos, diciembre 2014- febrero 2015 (Tesis de grado). Universidad Nacional San Agustín de Arequipa, Perú
- Ruiz, A. (2014). *Producción de lipasas de interés ambiental por microorganismos aislados a partir de material vegetal sometido a compostaje* (Tesis de grado). Universidad de Almería, España
- Ruiz, M., Ornelas, J., Olivas, G., Acosta, C., Sepúlveda, D., Pérez, D., Ríos, C., Salas, M. y Fernández, S. (2018). Efecto de Trichoderma sp. y hongos fitopatógenos sobre el crecimiento vegetal y calidad del fruto de jitomate. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(3), 444-456. doi: 10.18781/r.mex.fit.1804-5
- Saha, B. C., & Bothast, R. J. (1999). Pretreatment and Enzymatic Saccharification of Corn Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 76(2), 65–78. doi:10.1385/ABAB:76:2:65
- Samanta, A. K., Senani, S., Kolte, A. P., Sridhar, M., Sampath, K. T., Jayapal, N., & Devi, A. (2012). Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3), 466–474. doi:10.1016/J.FBP.2011.11.001
- Samuels, G. (2005). Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of Trichoderma spp. *Phytopatology*. 96(2), 195-206. doi: 10.1094/PHYTO-96-0195
- Samuels, G & Chaverri, P. (2003). Hypocrea/Trichoderma (ascomycota, hypocreales, hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology*. 48(48), 1-116. ISBN: 907035151X
- Samuels, G., Chaverri, P., Farr, D & Mcray, E. (1996). *Trichoderma Online: Systematic mycology and Microbiology laboratory*. ARS, USDA. Recuperado de <http://taxadescriptions/keys/Trichodermaindex.cfm>
- Sanchez, M. (2009). *Aislamiento y caracterización molecular y agronómica de Trichoderma spp. nativos del norte de tamaulipas* (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, México
- Sánchez, M., Moreno, L. y Páramo, L. (2021). Identificación morfológica y molecular de especies autóctonas Trichoderma spp., aisladas de suelos de importancia agrícola. *El Higo. Revista de Ciencia y Tecnología*, 11(1), 26-42. doi: 10.5377/elhigo.v11i1.11715

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Sandle, T. (2014). Examination of the Order of Incubation for the Recovery of Bacteria and Fungi from Pharmaceutical-grade Cleanrooms. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 18(3). 242-247. doi: 10.1111/jam.12487
- Santambrosio, J. y Ortega, M. (2009). Cátedra de Biotecnología. Siembra y recuento de microorganismos. Santa fe, Argentina: Departamento de Ingeniería Química de la Facultad Regional Rosario, Universidad Tecnológica Nacional de la República de Argentina
- Score, A & Palfreyman, J. (1994). Biological control of the dry rot fungus *Serpula lacrymans* by *Trichoderma* species: The effects of complex and synthetic media on interaction and hyphal extension rates. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 33(2), 115-128. doi: 10.1016/0964-8305(94)90031-0
- Silvia, N & Alvarez, S. (2005). *FUNDESYRAM*. Recuperado de <https://www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=5127>
- Sivan, A. & Chet, I. (1989). The possible role of competition between of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*, 79(2), 198-203. Doi: 10.1094 / Phyto-79-198
- Solano, C. (2006). *Microbiología de Alimentos: prácticas de microbiología de alimentos*. Navarra, España: Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales, Universidad Pública de Navarra
- Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza, A., & Stewart, A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*, 156(10), 2887-2900. doi: 10.1099 / mic.0.041715-0
- Steyaert, J., Weld, R., Mendoza, A., Kryštofová, S., Šimkovič, M., Varečka, L. & Stewart, A. (2013). *Trichoderma: Biology and Applications*. Oxfordshire, Reino Unido: CABI. Cap. V, pp. 87-108. ISBN: 1780642474
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. & Hess, W. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology (Reading, England)*, 142(2), 435-440. doi: 10.1099/13500872-142-2-435
- Tahara, T., Kraus, J & Rosember, L. (1990). Direct DNA sequencing of PCR amplified genomic DNA by the Maxam-Gilbert method. *BioTechniques*, 8(4), 366-368. ISSN: 2340169
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. Cap. III, VI y X, pp. 70, 173 y 284. ISBN: 978-950-06-0740-7

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Torres, M., Ortíz, C., Bautista, C., Ramírez, J., Ávalos, N., Cappello, S. y De la Cruz, A. (2015). Diversidad de Trichoderma en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 947-961. doi: 10.1016/j.rmb.2015.07.012
- Torres, L. (2005). *Efecto de la aplicación de Trichoderma harzianum para el control de Rhizoctonia solani en la variedad arroz INTA N1 bajo inundación en Sébaco, Nicaragua* (Tesis de grado). Escuela Agrícola Panamericana, Honduras
- Torrez, P. (2014). *Setas Alucinogenas*. Recuperado de <https://setasalucinogenas.com/cultivo/sustratos/fibra-de-coco/>
- Tovar, T. (2008). *CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y TÉRMICA DEL ALMIDÓN DE MAÍZ ( Zea mays L ) OBTENIDO POR DIFERENTES MÉTODOS DE AISLAMIENTO* (Tesis de grado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México
- Umaña, J., Orozco, S., Umaña, R., y Molina, R. (2019). Identificación molecular y características fisiológicas de aislamientos de Trichoderma para el biocontrol de dos patógenos en la piña. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(1), 125-142. doi: 10.15359/rca.53-1.7
- Vaillant, D., Almandoz, J., Gato, Y., Ramírez, R. y Díaz, J. (2016). Establecimiento de *Trichoderma spp.* en sustratos orgánicos empleados en casas de postura de Tecnología de Cultivo Protegido. *Fitosanidad*, 20(2), 95-96. ISSN: 1562-3009
- Vallejo, M. (2014). *Caracterización y clasificación de trichodermas nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal*. (Tesis de maestría). Universidad Técnica de Ambato, Ecuador
- Vargas, R., Wang, A., Obregón, M. y Araya, M. (2015). Efecto de *Trichoderma sp.*, *Paecilomyces lilacinus* y la inyección de nematicida en el pseudotallo en el combate de *Radopholus similis* y la producción de banano. *Agronomía Costarricense*, 39(2), 61-76. ISSN 0377-9424
- Vargas, T., y Villazante, L. (2014). Clasificación de los microorganismos. *Revista de actualizacion clinica*, 44(1), 2309-2313. ISSN: 2304-3768
- Vega, M. y Hernández, R. (2020). Crecimiento de Trichoderma en rastrojo de piña para obtener esporas para uso agrícola. *Agronomía Mesoamericana*, 31(3), 597-608. doi:10.15517/am.v31i3.40275
- Verma, M., Brar, S., Tyagi, R., Surampalli, R & Valero, J. (2007). Antagonistic fungi, Trichoderma spp. Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20. doi: 10.1016/j.bej.2007.05.012

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Villa, Y., y Espín, N. (2012). Determinación de la cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos y determinación de la actividad ligninoperoxidásica. *Revista Politécnica*, 31(1), 70-74. doi: 10.33333/RP.V31I0.192
- Villegas, M. (2019). *Trichoderma. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible*. (Tesis de grado). Universidad de Caldas, Colombia
- Walsh, G., Power, R and Headon, D. (1993). Enzymes in the animal feed industry . *Trends in Biotechnology*, 11(10), 424-430. doi: 10.1016/0167-7799(93)90006-U
- Widden, P and Scattolin, V. (1988). Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycology*, 80(6), 795-803. Doi: 10.1080/00275514.1988.12025726
- Windham, M., Elod, Y and Baker, R. (1986). A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopatology*, 76(3), 518-521. Doi: 10.1094/Phyto-76-518
- Xiong, J (2006). *Essential bioinformatics*. New York, Estados Unidos: Cambridge. (1st. Ed.), Cap. I, II, IV y V, pp. 3, 31, 127 y 173. ISBN: 0521600820
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R & Mukherjee, P. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30(2), 74-90. doi:10.1016/j.fbr.2016.05.001
- Zhang, C., Druzhinina, I., Kubick, C & Xu, T. (2005). *Trichoderma* biodiversity in China: Eidence for a north to southern distribution of species in East Asia, *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 251-257. doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.034

XI. ANEXOS

**Anexo 1. Preparación del TWEEN 80 al 0.1%.**

$$\% \frac{V}{V} = \frac{V_{\text{soluto}}}{V_{\text{disolución}}} * 100 \rightarrow V_{\text{soluto}} = \left( \frac{\% \frac{V}{V}}{100} \right) * V_{\text{disolución}}$$

$$V_{\text{soluto}} = \left( \frac{0.1}{100} \right) * 1000 \rightarrow V_{\text{soluto}} = 1$$

Por tanto, se necesitan 1 mL de TWEEN 80 y 999 mL de agua destilada, para preparar un volumen de 1000 mL de TWEEN 80 al 0.1%.

**Anexo 2. Relación del porcentaje de dilución de la melaza con azúcares reductores (AR) contenidos en la misma.**

*Melaza al 20% → 14.9 %AR*

*Meleza al 5% → X*

$$X = \frac{(14.9 \%AR) * (Melaza al 5\%)}{Melaza al 20\%} \rightarrow X = 3.73\%AR$$

**Anexo 3. Descripción del código de los cultivos aislados en el proyecto desarrollo de un proceso de producción de Trichodermas nativas previamente identificadas de diferentes regiones de Nicaragua.**

 Aislados de Terrabona, Matagalpa

Hongos

- El primer número indica el número de muestra inoculada.
- El segundo número indica los días los que tardó en aparecer el microorganismo.
- Las letras mayúsculas (TG) indican el lugar de procedencia de la muestra.
- El tercer número indica el número de placa de donde fue aislado el microorganismo.
- El cuarto número indica la cantidad de microorganismos asilados de una misma placa.

Bacterias

- La letra mayúscula (T) indica el lugar de procedencia de la muestra.
- El primer número indica los días que tardó en aparecer el microorganismo.

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

- Las letras mayúsculas (P o S) indican el medio de cultivo donde creció la bacteria, ya sea PDA o SDA.
- El segundo número indica el número de placa de donde fue aislado el microorganismo.
- El tercer número indica la cantidad de microorganismos aislados de una misma placa.

### Aislados de León

#### Hongos

- El primer número indica el número de muestra inoculada.
- El segundo número indica los días los que tardó en aparecer el microorganismo.
- Las letras mayúsculas (LM, LBT, LBB, etc.) indican el lugar de procedencia de la muestra (León Maíz, León Bosque Teca, León Bosque Bambú, etc.).
- El tercer número indica el número de placa de donde fue aislado el microorganismo.
- El cuarto número indica la cantidad de microorganismos aislados de una misma placa.

#### Bacteria

- Las letras mayúsculas (LBM) indica el lugar de procedencia de la muestra (León Bosque Muestra).
- El primer número indica el número de muestra inoculada.
- El segundo número indica el número de placa de donde fue aislado el microorganismo.
- El tercer número indica la cantidad de microorganismos aislados de una misma placa

*Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Anexo 4. Tabla con listado de códigos de los cultivos aislados de Terrabona, Matagalpa.**

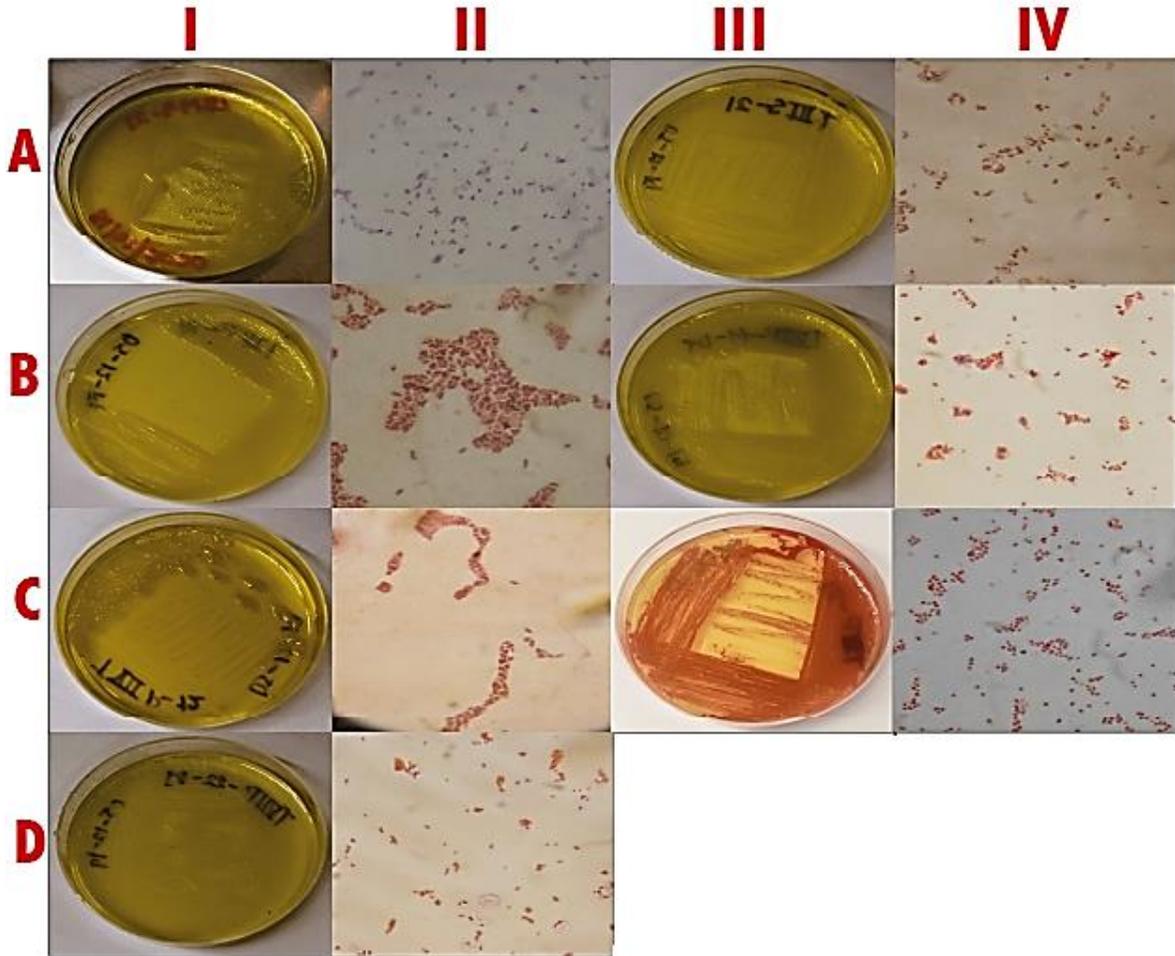
Sitios de muestreos	Hongos	Bacterias
Cultivo de tomate	72TG-12	T3S-21
		T4P-21
		T7P-11-01
	79TG-15-02	T7P-12
		T7P-21
		T7P-22-01
Cultivo de pepino	51TG-13	0
	51TG-12	
	51TG-11	
Área de ganado	82TG-13	0
	82TG-23	

**Anexo 5. Tabla con listado de códigos de los cultivos aislados de León**

Sitios de muestreos	Hongos	Bacterias
Caña	23LC-12	0
Maíz	36LM-11	0
	38LM-29	
	LMM3-26	
Bosque	46LB-12	LBM4-21
	46LB-13	
	46LB-15	
	53LB-21	
Bosque Teca	63LBT-11	0
	66LBT-22	
Bosque Eucalipto	86LBE-12	0
	88LBE-22	
Bosque Bambú	96LBB-13	0
	96LBB-16	
	96LBB-22	

*Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

Anexo 6. Morfología macroscópica de las bacterias en placa Petri y sus respectivas morfologías microscópicas en tinción de Gram observadas al microscopio con objetivo de 100x de 1 aislada en León (LBM4-21) y de 6 aisladas en Terrabona, Matagalpa (T3S-21, T4P-21, T7P-11-01, T7P-12, T7P-21, T7P-22-01). AI-AII: LBM4-21, BI-BII: T3S-21, CI-CII: T4P-21, DI-DII: T7P-11-01, EI-EII: T7P-12, FI-FII: T7P-21 y GI-GII: T7P-22-01 (Fuente propia).



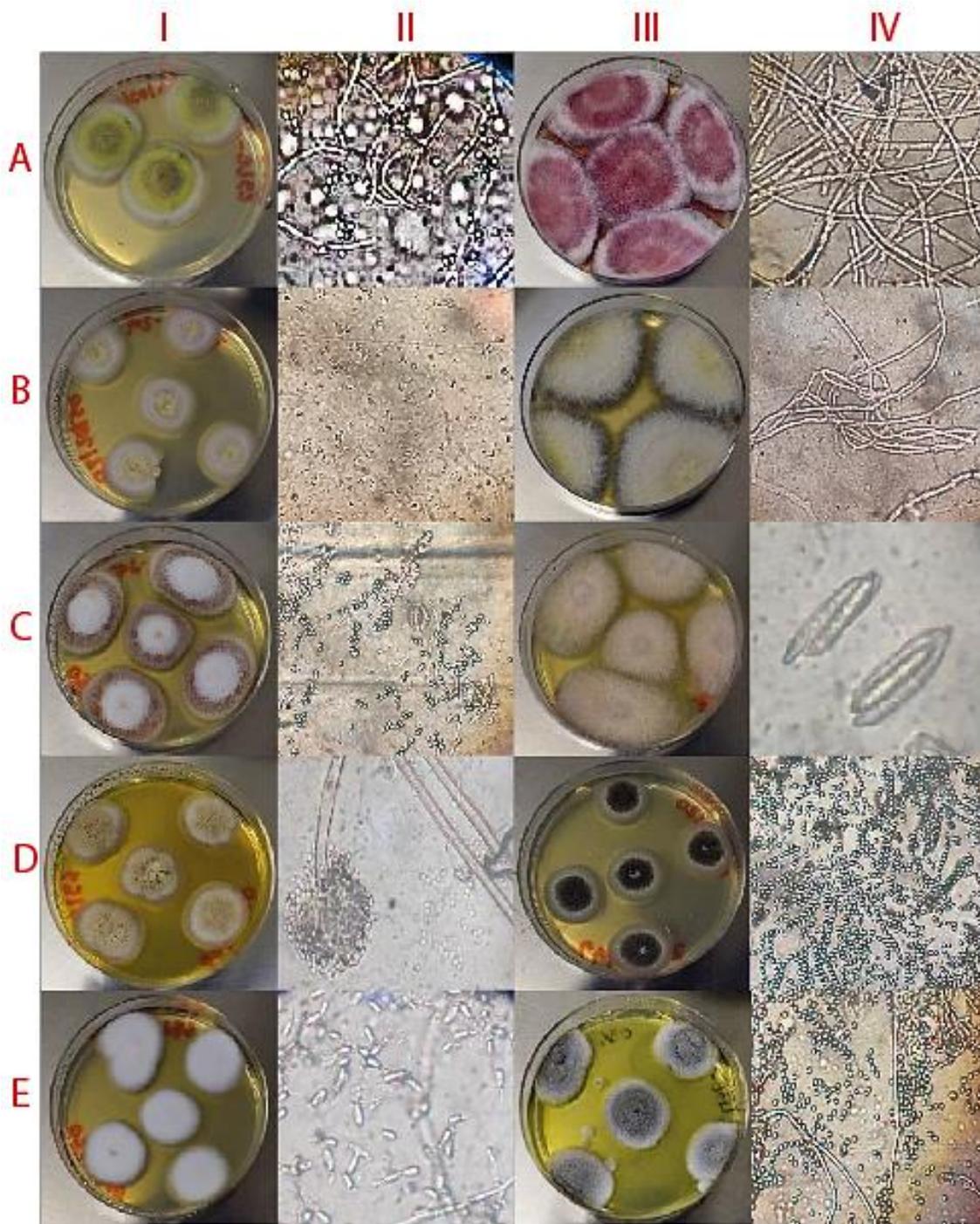
*Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Anexo 7. Tabla de caracterización morfológica macroscópica y microscópica de 1 bacteria aislada en León (LBM4-21) y de 6 aisladas en Terrabona, Matagalpa (T3S-21, T4P-21, T7P-11-01, T7P-12, T7P-21, T7P-22-01)**

<b>Código</b>	<b>Características morfológicas de bacterias</b>	
	<b>Observación macroscópica</b>	<b>Observación microscópica</b>
	<b>Apariencia de la colonia</b>	<b>Resultado de tinción de Gram</b>
<b>LBM4-21</b>	Colonias medianas de color amarilla con pigmentación del medio de color verdosa, brillante y cremosa, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Cocobacilos pequeños Gram positivas, dispersos o asociados en racimos.
<b>T3S-21</b>	Colonias pequeñas, planoconvexas, translúcida amarillenta, brillantes y cremosas, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Cocos medianos, Gram negativo, se encuentran sus colonias pegadas en formas de racimos.
<b>T4P-21</b>	Colonias medianas, planas, transparentosa de color crema, brillantes y cremosas, de forma fusiforme y bordes redondeados.	Cocobacilos medianamente grandes, Gram negativo, forma grandes estructuras.
<b>T7P-11-01</b>	Colonias medianas, superficie plana, color blanca translúcida y viscosa, de forma puntiforme y bordes redondeados.	Cocos puntiformes, Gram negativo.
<b>T7P-12</b>	Colonias grandes, superficie convexa, de color amarillento, brillantes y cremosas, de forma irregular y bordes redondeados.	Cocos medianos-pequeños Gram negativos, dispuestos en racimos.
<b>T7P-21</b>	Colonias pequeñas, superficie convexa, de color fucsia, brillantes y cremosas, de forma de puntiforme y bordes redondeados.	Estreptobacilos medianos, Gram negativo.
<b>T7P-22-01</b>	Colonias pequeñas uniformes, planas, transparentosa, brillantes y cremosa, de forma circular y bordes redondeados.	Bacilos formando cadenas, pequeños, Gram negativa.

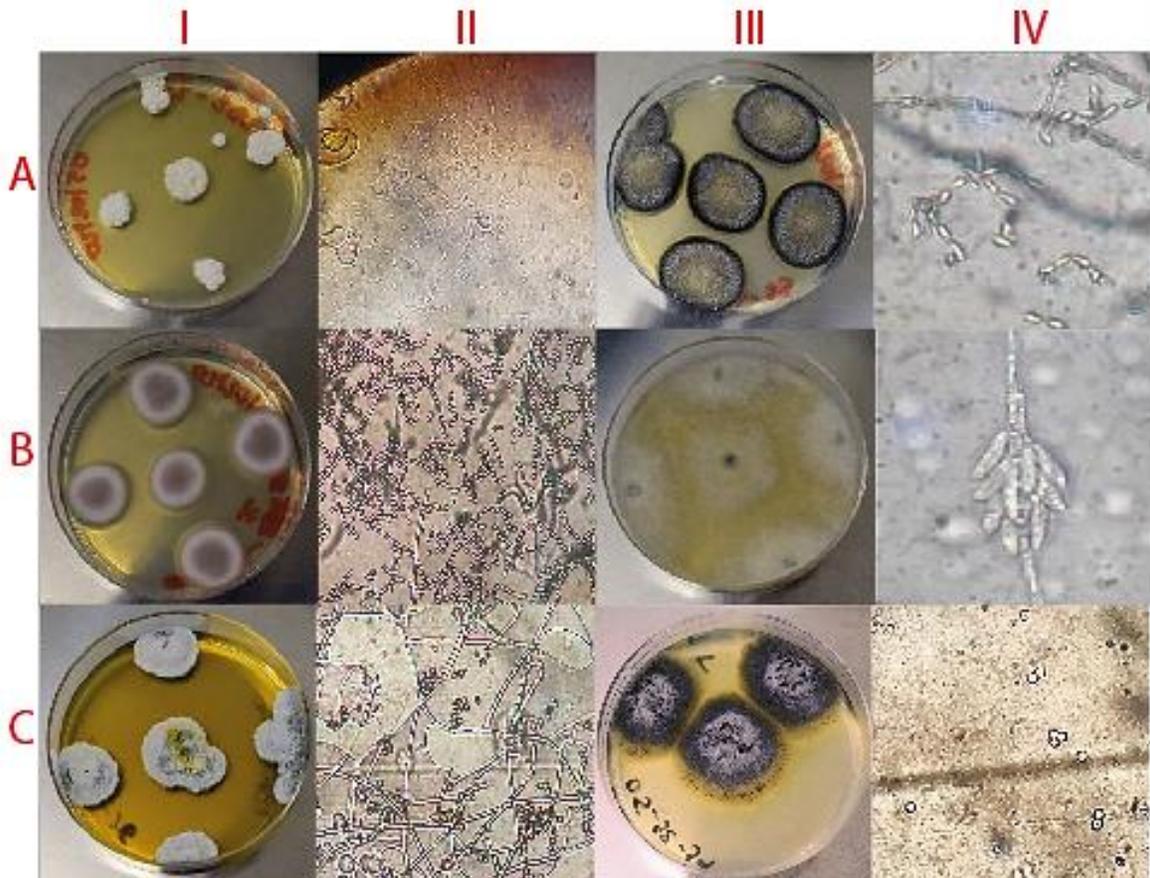
*Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Anexo 8. Características morfológicas macroscópicas de los hongos filamentosos en placa Petri y sus respectivas morfologías microscópicas de esporas con objetivo de 50x, aislados en León. AI-AII: 23LC-12, AIII-AIV: 36LM-11, BI-BII: 38LM-29, BIII-BIV: 46LB-13, CI-CII: 46LB-15, CIII-CIV: 53LB-21, DI-DII: 63LBT-11, DIII-DIV: 66LBT-22, EI-EII: 68LBT-22 y EIII-EIV: 86LBE-12 (Fuente propia).**



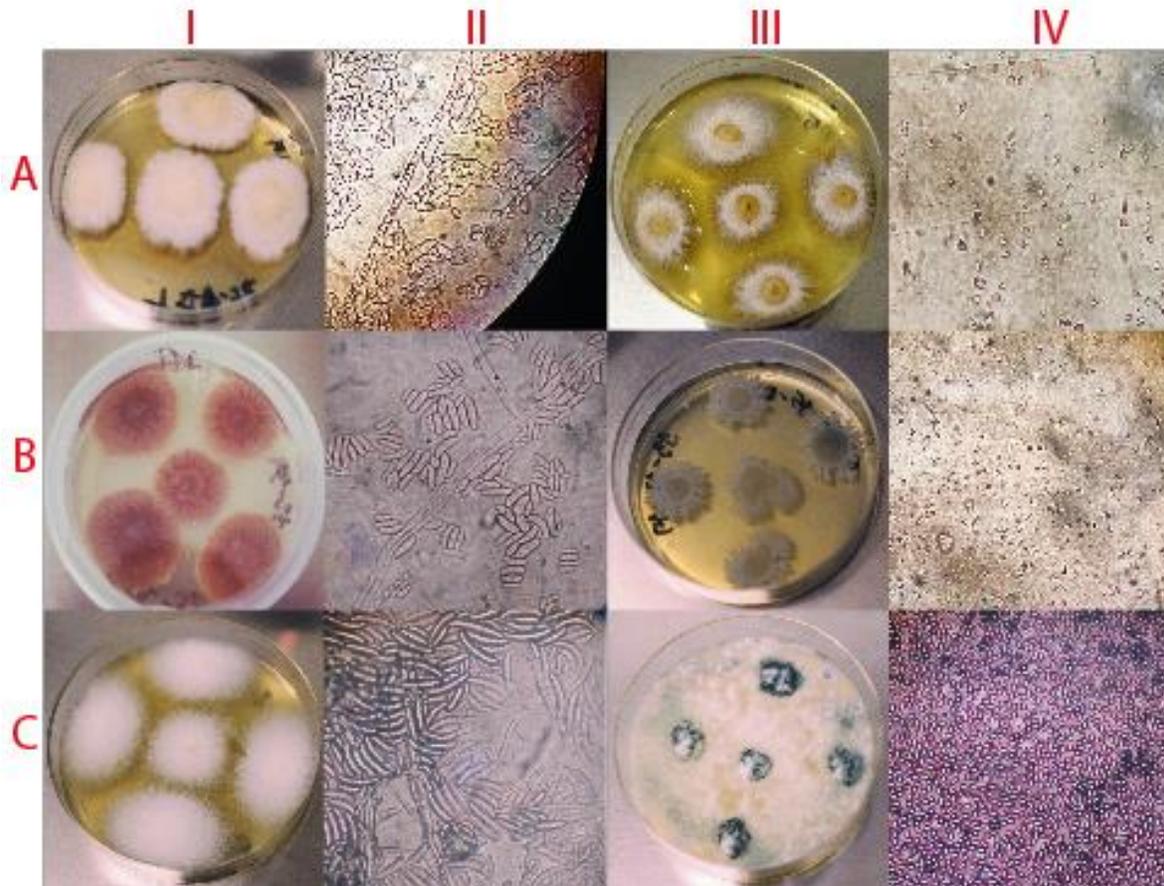
*Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Anexo 9. Características morfológicas macroscópicas de los hongos filamentosos en placa Petri y sus respectivas morfologías microscópicas de esporas con objetivo de 50x de 5 aislados en León (88LBE-22, 96LBB-13, 96LBB-16, 96LBB-22 y LMM3-26) y 1 aislado de Terrabona (51TG-11), Matagalpa. AI-AII: 88LBE-22, AIII-AIV: 96LBB-13, BI-BII: 96LBB-16, BIII-BIV: 96LBB-22, CI-CII: LMM3-26 y CIII-CIV: 51TG-11 (Fuente propia).**



*Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

**Anexo 10. Características morfológicas macroscópicas de los hongos filamentosos en placa Petri y sus respectivas morfologías microscópicas de esporas con objetivo de 50x, aislados en Terrabona, Matagalpa. AI-AII: 51TG-12, AIII-AIV: 51TG-13, BI-BII: 72TG-12, BIII-BIV: 79TG-15-02, CI-CII: 82TG-13 y CIII-CIV: 82TG-23 (Fuente propia).**



**Anexo 11. Tabla de caracterización morfológica macroscópica y microscópica de los hongos filamentosos aislados en León.**

<b>Características morfológicas de hongos filamentosos</b>				
<b>Código</b>	<b>Observación macroscópica</b>			<b>Observación microscópica</b>
	<b>Cultivo en placa</b>		<b>Aspecto del micelio</b>	<b>Forma de las esporas</b>
	<b>Anverso</b>	<b>Reverso</b>		
<b>23LC-12</b>	Amarillo con centros verdes y bordes blancos, con pigmentación del medio de color rosado.	Crema con bordes claros.	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Redondas con bordes finos.
<b>36LM-11</b>	Rosado con bordes blancos.	Rosado fucsia.	Colonia aterciopelada, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Sin observación.
<b>38LM-29</b>	Blanco con centro amarillento.	Crema con bordes claros.	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, crecimiento limitado a los puntos de siembra, producción de exudado, consistencia blanda y mucoide.	Ovaladas y lisa.
<b>46LB-13</b>	Blanco con centro amarillos	Verde con bordes blancos.	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, sin margen, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Sin observación.
<b>46LB-15</b>	Blanco con bordes rosados.	Crema con centro café.	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, superficie con surcos radiados, bordes filamentosos con producción de exudado, crecimiento limitado a los puntos de siembra,	Redondas y lisa.

*Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

			consistencia blanda y mucoide.	
<b>53LB-21</b>	Café claro con centro blanco.	Crema con centros oscuros.	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, sin margen, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Fusiformes.
<b>63LBT-11</b>	Café claro con bordes blancos.	Café oscuro con bordes blancos.	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra, producción de exudado, consistencia blanda y mucoide.	Redondas y lisa.
<b>66LBT-22</b>	Verde con bordes blancos.	Gris-verdoso con bordes blancos.	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia seca.	Redondas con bordes gruesos.
<b>68LBT-22</b>	Blanco.	Crema con centros oscuros.	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, sin margen, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Ovaladas y lisa.
<b>86LBE-12</b>	Gris-verdoso con bordes blanco.	Crema con centro café claro y bordes blancos	Colonia aterciopelada, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Redondas con bordes finos.

**Anexo 12. Tabla de caracterización morfológica macroscópica y microscópica de 5 hongos filamentosos aislados en León (88LBE-22, 96LBB-13, 96LBB-16, 96LBB-22, LMM3-26) y 1 aislado en Terrabona, Matagalpa (51TG-11).**

<b>Características morfológicas de hongos filamentosos</b>				
<b>Código</b>	<b>Observación macroscópica</b>			<b>Observación microscópica</b>
	<b>Cultivo en placa</b>		<b>Aspecto del micelio</b>	<b>Forma de las esporas</b>
	<b>Anverso</b>	<b>Reverso</b>		
<b>88LBE-22</b>	Blanco	Crema	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen entero, crecimiento limitado a los puntos de siembra, producción de exudado, consistencia seca y mucoide.	Redondas y lisa.
<b>96LBB-13</b>	Crema con bordes negros	Negro	Colonia algodonosa, forma circular, plana extendida, margen filamentosos, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Ovaladas y lisa
<b>96LBB-16</b>	Rosado con bordes blancos	Crema con bordes claros	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Semi ovaladas y lisa.
<b>96LBB-22</b>	Blanco con centro verde	Crema	Colonia lanosa, forma filamentosos, elevada, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia blanda.	Fusiformes.
<b>LMM3-26</b>	Gris-verdoso con blanco	Café con bordes claros	Colonia aterciopelada, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, crecimiento limitado a los puntos de siembra, producción de exudado, consistencia blanda y mucoide.	Redondas y con bordes gruesos.
<b>51TG-11</b>	Negro con centros blancos	Negro con bordes claros	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, producción de exudado, crecimiento limitado a los puntos de siembra, consistencia blanda y mucoide.	Redondas y lisa.

**Anexo 13. Tabla de caracterización morfológica macroscópica y microscópica de los hongos filamentosos aislados en Terrabona, Matagalpa.**

<b>Características morfológicas de hongos filamentosos</b>				
<b>Código</b>	<b>Observación macroscópica</b>			<b>Observación microscópica</b>
	<b>Cultivo en placa</b>		<b>Aspecto del micelio</b>	<b>Forma de las esporas</b>
	<b>Anverso</b>	<b>Reverso</b>		
<b>51TG-12</b>	Blanco con cetros amarillos	Crema con centros café	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Fusiformes.
<b>51TG-13</b>	Blanco con centros cremas	Café claro con bordes crema	Colonia aterciopelada, forma circular, plana, extendida, margen filamentosos, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda y mucoide.	Ovaladas y lisa.
<b>72TG-12</b>	Rojo vino	Rojo vino con centros claros	Colonia viscosa, forma circular, plana, extendida, margen entero, superficie con surcos radiados, crecimiento limitado a los puntos de siembra, consistencia blanda y mucoide.	Fusiformes.
<b>79TG-15-02</b>	Crema con bordes blancos	Crema con bordes claros	Colonia viscosa, forma circular, plana, extendida, margen irregular, crecimiento limitado a los puntos de siembra, consistencia blanda y mucoide.	Ovaladas y lisa
<b>82TG-13</b>	Blanco	Crema	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, margen entero, crecimiento limitado a los puntos de siembra y consistencia blanda.	Fusiformes
<b>82TG-23</b>	Verde con blanco	Crema con centros verdes	Colonia algodonosa, forma circular, plana, extendida, sin margen, crecimiento invasivo en la superficie del medio y consistencia seca.	Ovaladas y lisa.

**Anexo 14. Secuencia consensus (en formato FASTA) corregidas y alineadas, correspondientes a los hongos filamentosos identificados por vía molecular.**

**Secuencia 1. Cepa 20TG-01 (*Penicillium oxalicum*).**

>A

```
CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCC
GTGTTTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTCACGGCCGCGGGG
GGCATCCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACACAAACGAACTCTTG
TCTGAAGATTGCAGTCTGAGTACTTGACTAAATCAGTTAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC
CTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCAC
GGCTTGTGTGTTGGGCTCTCGCCCCCGCTTCCGGGGGGCGGGCCCCGAAAG
GCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCG
CTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGCCGCGAACACCATCAATCTTAACCAG
GTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA.
```

**Secuencia 2. Cepa 51TG-15 (*Penicillium oxalicum*).**

>B

```
CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGG
TCCAACCTCCCACCCGTGTTTATCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCT
CACGGCCGCGGGGGGCATCCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACAC
ACAAACGAACTCTTGTCTGAAGATTGCAGTCTGAGTACTTGACTAAATCAGTTA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT
GCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCTCGCCCCCGCTTCCGGG
GGGCGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTAT
GGGGCTTCGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGCCGGCGAACA
CCATCAATCTTAACCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA.
```

**Secuencia 3. Cepa 72TG-11 (*Trichoderma harzianum*).**

>F

GCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACC  
AAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAC  
CAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCG  
GGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAA  
ATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAAC  
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT  
CTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAG  
CGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCC  
CTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGC  
CTCTCCTGCGCAGTAGTTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCAC  
AGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC  
CCGCTGAACCTAAGCATATCAAT.

**Secuencia 4. Cepa T2 (*Trichoderma harzianum*).**

>H

TAGGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAT  
GTGAACGTTACCAACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCG  
CAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCTAAACTCTTATTGTA  
TACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAG  
GCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCAT  
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG  
AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCAT  
GCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTT  
GGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGT  
CTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGC  
GGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATC  
AGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAT.

**Secuencia 5. Cepa T1 (*Trichoderma harzianum*).**

>T1\_ITS1

CTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAG  
GCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTT  
TTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAAT  
CAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC  
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA  
ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT  
TTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCT  
TAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCC

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

TGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGGCGCGTCCACAGCCGT  
TAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTG  
AACTTAAGCATATC.

### **Secuencia 6. Cepa T3 (*Trichoderma harzianum*).**

>T3\_ITS1

CAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGA  
CCAAGGCGCCCGCCGGAGGACAACCAAACTCTTATTGTATACCCCTCGCG  
GGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAA  
TGAATCAAACCTTTCACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC  
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTCAATCATCGAATCT  
TTGAACGCCATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGC  
GTCATTTCTACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCCGCC  
TCCCTTAACGGGTGGCCGTCTACAAAATACAATGGGGTCTCGCCGCAGCCTC  
TCCTGCGCAGCCGTTTGCACACTCGCATCCGGAGCGCGGGCGCGCTACAGC  
CGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGTTCTCGGATCACGTAC.

### **Secuencia 7. Cepa CVD-06 (*Trichoderma harzianum*).**

>C14\_ITS1

TGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCG  
CAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTAT  
ACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGC  
GTTTCGAAAATGAATCAAACCTTTCACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG  
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA  
TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGC  
CTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGG  
GGATCGGCCCTGCCTCTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCT  
CGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGG  
CGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAG  
GTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAATATCTGTT  
AGCT.

### **Secuencia 8. Cepa CIXD-11 (*Trichoderma Sp*).**

>C15\_ITS1

TGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCGGGGCGCG  
TCGCAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAACTCTTT  
TTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTATTTTTGCTCTGAGC  
CTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACCTTTCACAA  
CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA  
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC  
CGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAAC  
CCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCCG

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

AAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACT  
CGCACCGGGAGCGCGGGCGCGGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAACCTTCTGA  
AATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAA  
ACCCGGAAGGAA.

**Secuencia 9. Cepa QIVD-12 (Trichoderma longibrachiatum).**

>Z16\_ITS1

ACTCCAAACTCTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCCGTCGCGGCTCTGTTTTAT  
TTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCA  
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA  
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTT  
CAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTCTGGCGTTGGGGGATCGGCCCTCACC  
GGGCCGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCATGCGCAG  
TAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCCGCGGCCACAGCCGTAAAACAC  
CCCAAATTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT  
TAAGCATATCAATAAGGCGGAGAAAATAACTACAGTCAAGGGCGGAGGGG  
GTAGAATGCCTAGCTGTATCCTT.

### Anexo 15. Cálculo de las concentraciones de esporas en la reproducción masiva sin y con melaza.

La ecuación que se utiliza para la cuantificación de esporas en ambas variantes, es la siguiente:

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{\bar{X}}{4}\right) * \left(\frac{V_{sol.}}{\text{g de muestra}}\right)$$

#### SIN MELAZA

➤ 72TG-11 (Trichoderma harzianum)

✓ Sustrato Arroz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{64}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 3.3 * 10^6$$

✓ Sustrato Maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{49.8}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 2.49 * 10^6$$

✓ Sustrato Olote de maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{34.8}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 1.74 * 10^6$$

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

➤ QIVD-12 (*Trichoderma longibrachiatum*)

✓ Sustrato Arroz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{488}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 2.44 * 10^7$$

✓ Sustrato Maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{518}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 2.59 * 10^7$$

➤ CIXD-11 (*Trichoderma sp.*)

✓ Sustrato Arroz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{60.2}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{5 \text{ mL}}{0.1 \text{ g}}\right) = 7.525 * 10^6$$

✓ Sustrato Maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{568}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 2.84 * 10^7$$

✓ Sustrato Olote de maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{120}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 6.0 * 10^6$$

➤ T3 (*Trichoderma harzianum*)

✓ Sustrato Arroz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{2060}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 1.03 * 10^8$$

✓ Sustrato Maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{258}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 1.29 * 10^7$$

✓ Sustrato Olote de maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{270}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 1.35 * 10^7$$

➤ CVD-06 (*Trichoderma harzianum*)

✓ Sustrato Arroz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{1840}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 9.2 * 10^7$$

✓ Sustrato Maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{720}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 3.7 * 10^7$$

## Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas

✓ Sustrato Olote de maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{66}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 3.3 * 10^6$$

### CON MELAZA

➤ 72TG-11 (*Trichoderma harzianum*)

✓ Sustrato Arroz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{780}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 3.9 * 10^7$$

✓ Sustrato Maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{820}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 4.1 * 10^7$$

✓ Sustrato Olote de maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{186}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 9.3 * 10^6$$

➤ QIVD-12 (*Trichoderma longibrachiatum*)

✓ Sustrato Arroz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{500}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 2.5 * 10^7$$

✓ Sustrato Maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{134}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 6.7 * 10^6$$

✓ Sustrato Olote de maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{432}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 2.16 * 10^7$$

➤ CIXD-11 (*Trichoderma* sp.)

✓ Sustrato Arroz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{480}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{5 \text{ mL}}{0.1 \text{ g}}\right) = 2.4 * 10^7$$

✓ Sustrato Maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{412}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 2.06 * 10^7$$

✓ Sustrato Olote de maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{270}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 1.35 * 10^7$$

## *Desarrollo de un proceso de Producción de Trichodermas*

➤ T3 (Trichoderma harzianum)

✓ Sustrato Arroz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{2720}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 1.37 * 10^8$$

✓ Sustrato Maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{1620}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 8.1 * 10^7$$

✓ Sustrato Olote de maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{270}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 1.06 * 10^7$$

➤ CVD-06 (Trichoderma harzianum)

✓ Sustrato Arroz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{1720}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 8.7 * 10^7$$

✓ Sustrato Maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{1140}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 5.7 * 10^7$$

✓ Sustrato Olote de maíz

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{g de relleno}} = (10^4) * \left(\frac{122}{4}\right) \frac{\text{esporas}}{\text{mL de solución}} * \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.5 \text{ g}}\right) = 6.1 * 10^6$$