



## A1-223 Producción de *Trichoderma viride* en diferentes sustratos agrícolas.

Amaro Leal J.L.<sup>1</sup>, Romero-Arenas O.<sup>2</sup>, Rivera T.A.<sup>3</sup>, Huerta L.M.<sup>4</sup>.

1 Manejo Sostenible de Agroecosistemas; Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), México; 2 Centro de Agroecología ICUAP, BUA; 3 Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP-BUAP; 4 Departamento de Desarrollo Sustentable ICUAP-BUAP.

### Resumen

Uno de los sustratos mayormente utilizados para reproducir a *Trichoderma* spp., es el grano entero de arroz, el cual tiene un costo relativamente alto en la producción de biofungicidas. Con el propósito de encontrar un sustrato económico y de fácil adquisición en la región de Tetela de Ocampo Puebla-México, en el cual la cepa nativa pueda presentar un buen desarrollo y una alta producción de esporas viables, se estableció esta investigación, que tuvo como objetivo evaluar 3 sustratos agrícolas en la reproducción y viabilidad de esporas de *Trichoderma viride*. Se evaluaron granos de maíz quebrado, trigo y arroz, donde se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento. El sustrato a base de maíz quebrado fue donde se obtuvo la mayor concentración de esporas la cepa TH-CA2 con 117.5 PEx104/ml y mostro un 99 % de viabilidad.

**Palabras clave:** reproducción; arroz; sustrato; cepa nativa; análisis químico proximal.

### Summary

One of the substrates mainly used to reproduce a *Trichoderma* spp., Whole grain is rice, which has a relatively high cost in the production of biofungicides. In order to find an affordable and readily available substrate in the region of Tetela de Ocampo Mexico Puebla, in which the native strain could present a good development and high production of viable spores, this research was established, which had the objective to evaluate three agricultural substrates in reproduction and spore viability *Trichoderma viride*. Grains of cracked corn, wheat and rice, which used a completely randomized design with five replicates per treatment were evaluated. The substrate based on cracked corn was where the greatest concentration of spores HT-CA2 strain with 117.5 PEx104 / ml was obtained and showed 99% viability.

**Keywords:** reproduction; rice, substrate; native strain; proximal chemical analysis.

### Introducción

En el suelo existen diversos microorganismos con capacidad antagónica hacia microorganismos fitopatógenos, el más estudiado es *Trichoderma* spp., debido a su fácil y rápido crecimiento (Howell y Stipanovic, 1995). Éste, es un habitante natural del suelo que se caracteriza por su comportamiento saprófito, propiedad que le proporciona ventajas antagónicas, tales como antibiosis, competencia por nutrientes, micoparasitismo a otros hongos, etc., permitiendo su selección y uso para el biocontrol en determinados cultivos agrícolas (Guigón y González, 2003; Romero *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2013).

La necesidad de reducir el uso de fungicidas en el control fitosanitario hace necesario desarrollar tecnologías que permitan de forma fácil, económica y efectiva obtener productos a partir de microorganismos endógenos con la calidad y cantidad suficiente para su aplicación masiva en las áreas de cultivo. *Trichoderma viride* se desarrolla bajo diferentes condiciones ambientales y de nutrientes; para su producción masiva en condiciones *in vitro*

tiene la capacidad de cultivarse sobre diferentes sustratos de bajo costo (Tronso y Gordon, 1998). Sin embargo, su producción a escala comercial presenta algunos inconvenientes como el desconocimiento de sustratos alternativos eficientes, infraestructura y equipo mínimo necesario, situación que ha limitado su desarrollo y utilización a mayor escala. Uno de los sustratos más utilizados es el grano entero de arroz, el cual tiene un costo relativamente alto, por lo cual se pretende incorporar el uso de sustratos regionales para su reproducción (Fernández-Larrea, 2004; Ramos, 2008).

Con base en la problemática presentada, la finalidad de esta investigación es encontrar un sustrato económico y de fácil adquisición en comunidades rurales del Municipio de Tetela de Ocampo Puebla-México en el cual *Trichoderma* spp., tenga un buen desarrollo y una elevada producción de esporas viables.

### **Materiales y métodos**

Se utilizó la cepa nativa de *Trichoderma viride* (TH-CA2), la cual pertenece al cepario del laboratorio de micología del Centro de Agroecología de la BUAP. Se prosiguió a su reproducción en sustratos estériles, utilizando para ello granos de maíz triturado, arroz, y grano de trigo, preparando 750 g de cada uno de ellos en frascos con capacidad de 1000 g, posteriormente de su pre cocción, fueron esterilizados a 120 °C en una autoclave con capacidad de 20 L durante 30 minutos, se tomó la lectura de pH en un potenciómetro marca Thermo Cientific® de cada uno de los sustratos antes mencionados.

Se inocularon utilizando para ello popotes estériles, tomando una porción de 5 mm de diámetro, con medio de cultivo previamente colonizado por las cepas TH-CA2, se colocó en la parte superior del sustrato en una campana de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad, se incubaron a temperatura ambiente. Para la obtención de esporas se agregó inicialmente 100 mL de agua destilada estéril a cada tratamiento con la finalidad de separar el mayor número de esporas, finalmente se aforó a 300 mL (Romero, 2007). La concentración de esporas de cada suspensión obtenida se realizó con la ayuda de una cámara hematimétrica de Neubauer (Lumycite, Propper, Manufacturing Co. Inc. Long Island, NY).

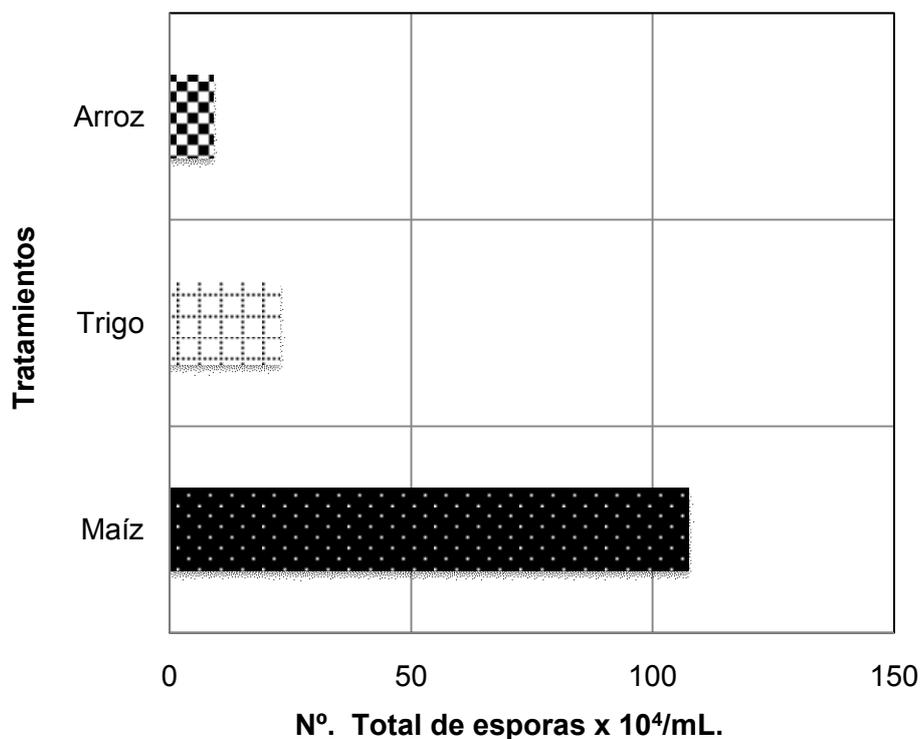
El conteo en la cámara se realizó cuatro veces para cada tratamiento y repetición, una vez contadas las esporas se aplicó la siguiente fórmula:  $NE / 8 = CE \times 10^4 / mL$ . Para determinar la viabilidad de las esporas, en cajas Petri de 9.0 cm de diámetro con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se sembraron 100 esporas, a partir de una suspensión de  $1 \times 10^4$  se utilizó 0.1 ml por caja. A las 48 horas posteriores a la siembra se contabilizó el número de unidades formadoras de colonias (ufc) germinadas.

Los 3 tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar, con 4 repeticiones. Los datos obtenidos se procesaron en el paquete estadístico SPSS Statistics versión 17 (Statistical Package for the Social Sciences) para realizar el análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se aplicó la prueba de comparación múltiples de Tukey ( $p < 0,05$ ), para determinar diferencias entre los tratamientos.

### **Resultados y discusión**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (15 días a temperatura ambiente), los granos estaban colonizados al 100% con la cepa nativa de *Trichoderma viride*. Se obtuvo el número total de esporas entre tratamientos en el cual resultó con mayor cantidad de esporulación el

sustrato (M) con  $107.51 \times 10^4$ / mL, seguido por (T) con  $22.81 \times 10^4$ / mL y por ultimo (A) con  $9.06 \times 10^4$ / mL (Figura 1).



**FIGURA 1.** Cepa TH-CA2 en relación con la cantidad de esporas en cada uno de los tratamientos.

Michel *et al.*, 2001 realizó una reproducción masiva del *Trichoderma harzianum* en sustratos obteniendo en el grano de arroz 3.13, grano de alpiste 2.31 y maíz quebrado 0.25 número de esporas x  $10^4$  mL<sup>-1</sup>. Ezziyyani *et al.*, 2001, obtuvieron un recuento de  $32 \times 10^4$  conidios / mL, en caldo de arroz 3 % preinoculo  $14 \times 10^7$  conidios / mL.

Los rangos del porcentaje de viabilidad de *Trichoderma viride* son muy heterogéneos entre los tratamientos, ya que la diferencia entre el mayor y el menor fue de 43.0 %; el sustrato que tiene una excelente germinación es el Maíz triturado con un 99 %, seguido por el grano de Trigo (78 %) mientras que el sustrato de grano de Arroz obtuvo el menor porcentaje (56 %) de viabilidad (Tabla 1).

**TABLA 1.** Características macro-microscópicas de la cepa de *Trichoderma viride*, en sustratos esterilizados y porcentaje de esporulación.

Características macroscópicas de la colonia de la cepa de <i>Trichoderma viride</i>										
Tratamiento	Clave	pH inicial	Textura	Densidad	Micelio aéreo	Color	PEx 10 <sup>4</sup> /ml*	% Viabilidad	pH final	
Grano de Arroz	TH-CA2	6.8	Algodonosa	Escaso	Abundante	Verde / oscuro	9.06 c	56	7.7	
Maíz Triturado	TH-CA2	5.8	Lanosa	Abundante	Abundante	Verde	117.5 a	99	6.8	
Grano de Trigo	TH-CA2	5.2	Lanosa	Escaso	Abundante	Verde /oscuro	22.81 b	78	6.5	

\* Letras diferentes en columnas significan diferencia estadística entre la cepa de *Trichoderma viride*, con la prueba de medias de Tukey al 0.05.

### Conclusiones

En general, los resultados obtenidos corroboran que la producción masiva de *Trichoderma viride* presenta la facilidad de cultivarse sobre diferentes sustratos agrícolas de bajos costos y provenientes de las regiones rurales. El sustrato más recomendable para la cepa TH-CA2 es el maíz, ya que presentó mayor colonización en todas las muestras utilizadas, además un porcentaje de esporulación entre  $117.50 \times 10^4$ / mL con el 99% de viabilidad.

### Referencias bibliográficas

- Howell, C.R., R.D. Stipanovic, 1995. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* induced cotton seedling diseases by *Gliocladium virens*: Antibiosis. *Phytopathology*, 85:469–472 p.
- Fernández-Larrea, V. O. 2004. Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad. Laboratorio de Hongos Entomopatógenos. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). La Habana Cuba. 10 p.
- Guigón L. y González, A. 2003. Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp., Con actividad antagonica sobre *Phytophthora capsici* leoniana y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.), Centro de Investigaciones para los Recursos Naturales, Chihuahua México.
- Michel, A., Otero, M., Martínez, D., Araiza, R., Barrios, A y Rebotello, A. 2001. Control biológico invitro de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. *Avances en Investigación Agropecuaria*. Universidad de Colima México. 12 (3): 55-68 p.
- Ramos, E. Y. A., Navarro, R. I. Z., Zumaqué, L. E. O., y Violeth, J. L. B. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. X, Núm. 2, pp. 23- 34.
- Romero A.O. 2007. Technological development to control green mold attack (*Trichoderma* spp) For commercial cultivation of edible fungi (*Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*) in Mexico, MSc Thesis, Postgraduate College, Puebla. Pp 107.
- Romero Omar, Tello Isaac, Damián M. Angel, Villareal Oscar, Aragón Agustin and Parraguirre Conrado. 2013. Identification and Evaluation of *Trichoderma* spp Native, Present on eroded soils in



- Tetela de Ocampo, Puebla-Mexico. *International Research Journal of Biological Sciences*, Vol. 2(4), 1-7.
- Romero, O., Huerta, M., Damián, M. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Rev. Colomb. Biotecnol* 11:2 p.
- Tronsmo, A. And Gordon. 1998. Biological control with *Trichoderma* species. Boland, G.; kuykendall, L. D. Plant-Microbe interactions and biological control. 2 ed. Marcel Dekker. 442p.