

Producción de *Trichoderma Harzianum* en diferentes sustratos orgánicos

Cintha Margarita Benites Bellino*, Liliam Carina Marroquín **

RESUMEN

Trichoderma harzianum es un hongo que actúa como agente de control biológico. La producción de este agente se realiza mediante métodos artesanales, para cultivos líquidos, estáticos, sólidos y bifásicos. Uno de los sustratos más utilizados para la producción masiva de *Trichoderma harzianum* es la casulla de arroz más harina de maíz; ésta tiene un costo relativamente alto y es de difícil adquisición. Esta investigación se estableció con el propósito de encontrar un sustrato orgánico, económico y de fácil adquisición en la región, con el que *Trichoderma harzianum* tenga una alta producción de esporas. En este estudio se evaluaron los sustratos: sorgo, maíz, olote y bagazo de caña. Después de los estudios realizados se obtuvo como resultado que el sorgo fue el mejor sustrato, tanto, en producción como en germinación de esporas.

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*, producción masiva, sorgo, agente de control biológico.

ABSTRACT

Trichoderma harzianum is a fungus that acts as a biological control agent. The production of this agent is made by traditional methods for liquid, static, solid and biphasic cultures. One of the most commonly used substrates for mass production of *Trichoderma harzianum* is the mixture between rice chasuble and corn dough, which is quite expensive and hard to acquire. The purpose of this research was to find an affordable organic substrate to enhance a high production of *Trichoderma harzianum* spores. In this study the following substrates were evaluated: sorghum, corn, and sugarcane bagasse. Sorghum resulted as the best substrate, both in production and spore germination.

Key Words: *Trichoderma harzianum*, mass production, sorghum, biological control agent.

* Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Centro Universitario Regional del Litoral Pacífico. Departamento de Agroindustria. Carrera de Ingeniería Agroindustrial.

** Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Centro Universitario Regional del Litoral Pacífico. Departamento de Agroindustria. Carrera de Ingeniería Agroindustrial. Asesora. carimarroquin@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos tales como hongos, bacterias o nematodos constituyen la mayor causa de pérdida en la producción agrícola. Generalmente se controlan con fungicidas químicos, los cuales se aplican al suelo, semillas, follaje y fruto. Las consecuencias adversas sobre la salud, la contaminación del ambiente, la residualidad y el desarrollo de resistencia a estos fitopatógenos han generado la búsqueda de alternativas en agentes biológicos. Aprovechando el efecto adverso de hongos y bacterias sobre diversos microorganismos el hombre ha creado agentes de biocontrol capaces de contrarrestar el efecto patógeno en el suelo y las plantas. (Infante, Martínez, Gonzales y Reyes, 2001).

El género más conocido es la *Trichoderma*, debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, flexibilidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos. Recientemente se detectó su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos. Al aplicar este hongo a las semillas, plantas en vivero, recién trasplantadas o plantas establecidas, éste coloniza las raíces formando una capa protectora sobre ellas con la ventaja que el hongo crece con las raíces formando una especie de guante, protegiéndolas siempre. El hongo y las raíces forman una simbiosis. El hongo se alimenta y vive del exudado que producen las raíces pero el hongo al colonizar las raíces les confiere protección (Infante, Martínez, Gonzales y Reyes, 2001).

Las especies de este género *Trichoderma* se caracterizan por ser saprófitos, ya que sobreviven en suelos con diferentes cantidades y tipos de materia orgánica, los cuales tienen capacidad de descomponerla y en determinadas condiciones se vuelven anaerobios (Infante, Martínez, Gonzales y Reyes, 2001). Entre los mecanismos de control referenciados para *Trichoderma spp* está la competencia por nutrientes o espacio, el micoparasitismo y la antibiosis. La utilización de productos y subproductos agrícolas con altos contenidos celulósicos plantea la posibilidad de reemplazar los sustratos utilizados como el arroz y el trigo, los cuales actualmente encuentran limitada su utilización por los altos costos. (Zerega, 2005).

Con base en los problemas presentados, esta investigación se realizará con el fin de encontrar un sustrato económico y de fácil adquisición en la zona sur en el cual *Trichoderma harzianum* se desarrolle de forma eficiente y tenga una elevada producción de esporas viables, para el uso en el cultivo de melón, chile, tomate, caña de azúcar y otros.

MÉTODOS

Diseño y población

Para este estudio se usará un diseño experimental de bloques completamente al azar, analítico descriptivo de corte transversal. Considerando cada uno de los diferentes tratamientos, se hicieron en cuatro repeticiones resultando un total de ocho unidades experimentales.

Entorno

El estudio se realizó en el laboratorio de Biología del CURLP (Centro Universitario Regional del Litoral Pacífico) el cual se encuentra ubicado en el extremo sur este de la ciudad de Choluteca, con temperaturas media anuales de 29 °C, con una altura de 43 metros sobre el nivel del mar. Esta ciudad tiene una humedad relativa promedio de 68.3% y una precipitación anual de 2000 mm y se localiza entre 13° 19' 05' latitud Norte y 87° 09' 13' latitud Oeste (Copeco y Aeronáutica Civil).

Intervenciones

Con un aislado de *Trichoderma harzianum* proveniente de la colección de cepas del laboratorio de Biología del CURLP, se evaluó la producción de esporas en sustratos sólidos, haciendo uso de desechos de la industria azucarera y agronómica como ser bagazo de caña y olote de maíz y otras gramíneas como el maíz y sorgo. Como testigo se utilizó casulla de arroz más harina de maíz.

Preparación de los sustratos

Se trituraron los sustratos por separado hasta obtener partículas de 0,5-3,0 mm de diámetro, se colocaron en distintos recipientes, agregándole 40 ml de agua a cada uno y se mezclaron de tal forma que todo el sustrato quedó húmedo. Seguidamente se colocaron 150g de los diferentes sustratos en las botellas de vidrio, colocándoles tapones de algodón y gasa. Luego se envolvieron con papel trazo y se esterilizaron en autoclave por 30 minutos a 125°c.

Inoculación de los sustratos

Para la obtención de los inóculos, se trabajó con cultivos puros del aislado de *Trichoderma harzianum* de 72 horas de incubación en agar PDA. El sustrato estéril una vez frío se inoculó en condiciones asépticas agregando una suspensión 25 ml

de *Trichoderma harzianum*. Cumplidas 48 horas de incubación se removieron las botellas para oxigenar el sustrato, sin quitar el tapón y se dejaron incubar por seis días en total, alternando periodos de luz y oscuridad. Pasado el periodo de incubación se sustrajo el sustrato de las botellas para secar el producto final durante tres días.

Recuento de esporas

La concentración de esporas como producto final fue de un (1) gramo, del cual se realizó una dilución de 1:10 y se colocó la muestra en la cámara de conteo o *neubaubuer*.

Porcentaje de viabilidad

La viabilidad de las esporas se determina a partir de una muestra de 0.1ml de una dilución de 1:10, y se deposita en una placa petry con una capa muy fina de medio de cultivo PDA. Se incuba por 16 horas, y se observa en el microscopio determinando así las esporas germinadas y no germinadas.

Prueba de patogenicidad

Para esta prueba se hizo una interacción hongo-hongo, en una placa que contenía medio de cultivo PDA. En un extremo, se colocó una muestra de *Trichoderma harzianum* y en el otro, una muestra igual de *Fusarium oxysporum*, como testigo para comparar la interacción de ambos hongos. Midiendo los diámetros de crecimiento de ambos hongos se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento provocado por *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum*.

Análisis estadístico

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan, ésto para comparar las medias de los tratamientos. Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico InfoStat versión 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de esporas por gramo

Se inoculó el aislado de *Trichoderma harzianum* en los cinco diferentes sustratos, utilizando 40 ml de inóculo por 150 g de sustrato. El crecimiento del aislado de

Trichoderma harzianum fue óptimo, al observarse desarrollo y esporulación favorable en algunos sustratos. El crecimiento fue rápido, alcanzando a cubrir toda la superficie del medio a las 120 horas (color verde claro) en el sorgo y maíz. A los seis días se presentaron concentraciones que van desde las 6.7×10^6 esporas/g hasta 8.3×10^8 esporas/g. En el olote y bagazo no se presentó un buen crecimiento, no se cubrió todo el medio y la esporulación fue escasa.

Algunos factores que no permitieron el óptimo desarrollo de *Trichoderma harzianum* fueron: la temperatura, la humedad no controlada, el alto contenido en fibra y la poca disponibilidad de celulosa y almidón en algunos de los sustratos.

Porcentaje de viabilidad

Para la prueba de viabilidad se tomó una muestra de cada uno de los tratamientos. Se hizo una dilución 1:10 y se tomó 0.1ml, luego se depositó en una placa con medio de cultivo PDA, pasadas 16 horas de incubación se realizó el recuento. El porcentaje de viabilidad más alto se obtuvo en el tratamiento testigo (*Fusarium oxysporum*) con un 97%. De los tratamientos experimentales el sustrato con el más alto porcentaje de germinación fue el sorgo con 96% y el sustrato con menor porcentaje de viabilidad fue el olote con 93%.

Prueba de patogenicidad

Esta prueba se realiza para determinar el mecanismo de acción mediante el cual *Trichoderma harzianum* actúa contra *Fusarium oxysporum*. Se desarrolló colocando una muestra de *Trichoderma harzianum* en un extremo de una placa que contenía medio de cultivo PDA y en el otro extremo se depositó una muestra igual de *Fusarium oxysporum*. Transcurridos 6 días se midieron los diámetros de crecimiento de cada hongo y se calculó el porcentaje de inhibición provocado por *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum*.

CONCLUSIONES

- *Trichoderma harzianum* es un hongo muy versátil y de fácil manipulación, que tiene la capacidad de adaptarse a diversas condiciones ambientales y desarrollarse en muchos sustratos.
- El sorgo presentó los mejores resultados en cuanto a la producción de esporas de *Trichoderma harzianum*; fue con una concentración de 8.3×10^8 esporas/ gramo de los cuatro tratamientos evaluados.
- Los porcentajes de viabilidad en todos los tratamientos fueron altos, lo que indica

que en los sustratos no existen sustancias que afecten negativamente el crecimiento de *Trichoderma harzianum*.

- *Trichoderma harzianum* tuvo un mejor desarrollo en aquellos sustratos ricos en almidón y con porcentajes medios de fibra que en aquellos con niveles bajos de almidón y porcentajes muy elevados de fibra.

BIBLIOGRAFÍA

- Caballos Margarita. Control biológico de plagas (En línea). Consultado el 10 de febrero 2010. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos29/control-plagas/control-plagas.shtml>
- Carrillo Leonor, 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. (En línea) Consultado el 7 de abril de 2010. Disponible en <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/06htextofusarios.pdf>
- Castaño-Zapata, 1994. Principios básicos de Fitopatología. Escuela Agrícola Panamericana, Departamento de Protección Vegetal. Tegucigalpa, Honduras.
- Cave Ronald, 1995. Manual para la enseñanza del control biológico en América Latina. Escuela Agrícola Panamericana, Departamento de Protección Vegetal. Tegucigalpa, Honduras.
- Cervantes Miguel Ángel. Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos (En línea). Consultado el 10 de febrero 2010. Disponible en http://www.infoagro.com/hortalizas/microorganismos_beneficiosos_cultivos.htm
- *Delgado Higuera Mario*. Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal. (En línea). Consultado el 9 febrero 2010 Disponible en <http://www.oriusbiotecnologia.com/portal/content/view/14/7/>
- El maíz en la alimentación humana. (En línea) Consultado el 5 de marzo 2010. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S03.htm>
- Gonzales Francisco, 2007. Uso en la agricultura de *Trichoderma* (En línea). Consultado el 10 febrero 2010. Disponible en <http://www.chilefruta.com>
- Infante I, Martínez B, Gonzales N, Reyes Y. (abril de 2009). Revista de Protección Vegetal. Recuperado el febrero de 2010, de Revista de Protección Vegetal: <http://scielo.sld.cu/scielo.php>
- M. Stefanova, 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp* para el control de hongos fitopatógenos del suelo (En línea). Revista de la facultad de agronomía. Consultado el 9 febrero 2010. Disponible en http://www.revfacagronluz.org.ve/v16_5/v165z006.html
- Norte Alfredo, 2006. "Trichoderma" (En línea). Consultado el 9 febrero 2010 Disponible en http://www.spainbonsai.com/tricho_es.html

- Oliva Deny, 2001. Aproximación experimental a la combustión del bagazo de caña en lecho fluidizado (En línea) Consultado el 13 de abril de 2010) disponible en <http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar03/HTML/articulo03.htm>
- Panozo Pérez Jicela, 2001. Reproducción de *trichoderma spp.* en diferentes sustratos con fines de control biológico (En línea). Consultado el 10 febrero 2010. Disponible en <http://www.agr.umss.edu.bo/invest/jpanozo.htm>
- Pérez Sánchez Consuelo. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) (En línea). Consultado el 24 de febrero 2010 Disponible en <http://revistas.um.es/analesbio/article/view/30441/29631>
- Zerega, N. (2005). Revista Colombiana de Biotecnología. Recuperado el 15 de febrero de 2010, de www.sci.unal.edu.co/scielo.php