

Producción artesanal del hongo antagonico *Trichoderma* Persoon en sustrato sólido

María Cristina Sandoval¹, Cristian Belesansky²

¹ Cátedra de Fitopatología. FCA-UNLZ. ² Becario CIN

Resumen

Uno de los agentes de control biológico (ACB) más estudiados a nivel mundial es *Trichoderma* spp. Un microorganismo que posee la capacidad de interferir en los procesos vitales de patógenos fúngicos. La utilización de *Trichoderma* como ACB, contribuye tanto a favorecer la sanidad, el rendimiento y la inocuidad de los productos agrícolas, como a disminuir el impacto ambiental causado por el uso frecuente de productos químicos para el control de plagas y enfermedades de las plantas. En este contexto, en la presente nota técnica se describen las etapas comprendidas entre el aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* hasta su producción artesanal en un sustrato sólido. Esta producción puede ser desarrollada por agricultores familiares en el camino de asegurar la producción de alimentos sanos y seguros

Palabras clave: *Trichoderma*. Producción. Sustrato sólido

Introducción

El control biológico es el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Serrano Carreón y Galindo Fentanes, 2007). Esta herramienta de manejo se sustenta en microorganismos beneficiosos que establecen interacciones directas de tipo antagonista con el patógeno y de tipo indirectas como la estimulación de defensas del huésped (Harman, 2000). Los mecanismos de efecto directo incluyen la competencia por el espacio y los nutrientes, la inactivación de los sistemas de ataque del patógeno, la modificación de la rizosfera, la secreción de metabolitos con efecto antibiótico y el ataque directo a otros hongos (micoparasitismo) (Rincón *et al.*, 2008).

Uno de los agentes de control biológico (ACB) más estudiados a nivel mundial es *Trichoderma* spp, un microorganismo fúngico del cual se ha demostrado que posee capacidad para interferir en los procesos vitales del patógeno (Martínez *et al.*, 2013; Pineda Insuasti *et al.*, 2017); en años recientes, la utilización de técnicas moleculares en micología evolutiva han mostrado que existen más de 100 especies (Torres *et al.*, 20015).

Trichoderma posee tanto actividad antagonista como estimuladora del crecimiento vegetal.

La utilización de ACB como *Trichoderma*, contribuye tanto a favorecer la sanidad, el rendimiento y la inocuidad de los productos agrícolas, como a disminuir el impacto ambiental causado por el uso frecuente de productos químicos para el control de plagas y enfermedades de las plantas (Serrano Carreón y Galindo Fentanes, 2007).

La producción de bioinsumos a base de *Trichoderma* involucra una serie de etapas que buscan obtener un producto que transporte el mayor número de esporas viables para el control de enfermedades fúngicas y bacterianas de plantas (Companioni González *et al.*, 2019). El proceso se compone de una primera etapa donde tiene lugar el aislamiento de cepas de *Trichoderma* y las pruebas de efectividad *in vitro* e *in vivo*, que permiten la selección de cepas promisorias para su inclusión en la segunda etapa. Donde se procede a la preparación y acondicionamiento del sustrato; la inoculación de los sustratos, incubación, secado, envasado y control de calidad (Sandoval, 2012). En este contexto, en la presente nota técnica se describen ambas etapas en relación a la producción artesanal de *Trichoderma* sobre un sustrato sólido. Enfatizando que las actividades comprendidas en la segunda etapa pueden ser desarrolladas por agricultores familiares en el camino de asegurar la producción de alimentos sanos y seguros

Primera etapa: aislamiento de cepas de *Trichoderma* y pruebas de efectividad de *Trichoderma*

Aislamiento: El aislamiento debe privilegiar la búsqueda y obtención de aislamientos autóctonos (también denominados nativos o residentes) (Arcia, 1995), dado que se espera que estos aislamientos “presenten un comportamiento que se adecua a las condiciones agroecológicas regionales” (Vallejo Ilijama, 2014). A través de un muestreo dirigido se recolectan muestras donde la enfermedad o las enfermedades de interés estén presentes con baja intensidad. También, se recomienda obtener muestras en lotes donde en lugar de agroquímicos se utilicen biopreparados y enmiendas orgánicas.

Procedimiento: se toma con una pala a 10 -20 cm de profundidad una muestra compuesta de suelo (10 submuestras) por lote. Las muestras se colocan en bolsas de polietileno rotuladas. En el laboratorio se debe proceder a tamizar el suelo previamente oreado con un tamiz de malla de 2 mm, embolsar, rotular y llevar a heladera. En este punto, pueden utilizarse dos técnicas: i) Suspensión y dilución del suelo, 1 g de suelo se coloca en 9 ml de solución salina estéril. A partir de esta dilución 10^{-1} se preparan diluciones seriadas y se siembra con una pipeta estéril 1 ml, generalmente de la dilución 10^{-3} o superior, en una placa de Petri conteniendo medio agar papa glucosado (APG) o medio selectivo para *Trichoderma*, modificado por Smith *et al.* (1999). Las placas sembradas se incuban a 25^o C durante 7 días; ii) Cámara húmeda, utilizando submuestras de 25 g que se distribuyen en placas de Petri en cámara húmeda durante 7-8 días.

En ambos casos se realizan observaciones diarias hasta la aparición de colonias de hongos con características de crecimiento similares a los de *Trichoderma*. Esto es, colonias de crecimiento rápido y coloración - blanca, verde, amarillo, verdosas -, las áreas con conidios se presentan con anillos concéntricos (Figura 1), revés de las colonias usualmente no coloreado, amarillo o amarillo verdoso (Barnett y Hunter, 1972). A partir de las colonias que presentan estas características se realizan preparaciones – utilizando

portaobjetos, solución de montaje y cubreobjetos- para su observación en microscopio óptico en búsqueda de las estructuras características del hongo: conidióforos erectos, hialinos, ramificados y no verticilados, en grupos o solitarios; fiálides en forma de pera, únicas o en grupos, hinchadas en la región central y delgadas en el ápice. El ángulo de inserción entre las fiálides y los conidióforos es recto; conidios unicelulares oblongos o sub oblongos, lisos o equinulados. De color verde o hialinos y se presentan en masas en los ápices de las fiálides (Rifai, 1969; Samuels, 2006) (Figura 2).

Al séptimo día de la incubación, se toma una porción superficial de esporas de las colonias identificadas positivamente como *Trichoderma* para su siembra en tubos de ensayo con APG para su conservación. Como alternativa para garantizar la pureza de las cepas: a partir de la porción de esporas se prepara una suspensión de estas en solución salina. Esta suspensión se siembra en placas con medio agar agua y a partir del crecimiento en este medio se toma, utilizando el microscopio óptico, una espora germinada para lograr los aislados monospóricos. Las colonias desarrolladas se transfieren a tubos de ensayo con APG para su conservación (Samaniego Fernández *et al.*, 2018).



Figura 1. Colonias de distintos aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre medio de cultivo APG

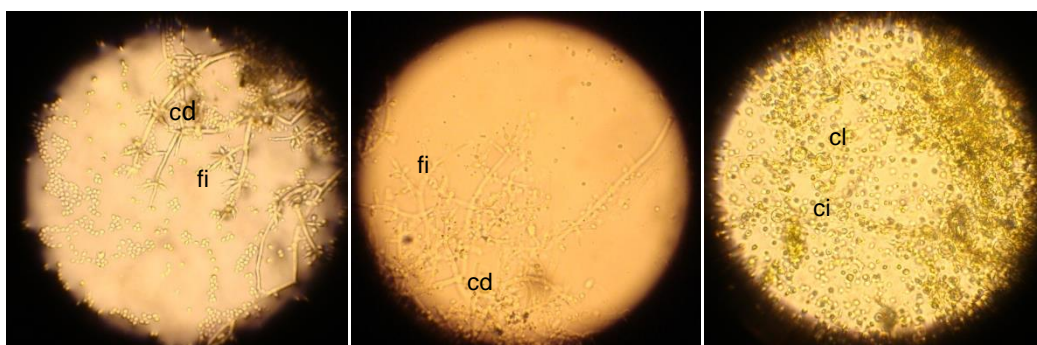


Figura 2. Estructuras de *Trichoderma* (40X), conidióforos: cd; fiálides: fd; conidios: ci; clamidosporas: cl.

Pruebas de antagonismo

In vitro: Para la realización de estas pruebas se utiliza la técnica de cultivo dual. En placas de Petri con medio APG se depositan discos de micelio (5 mm) de cada aislamiento de *Trichoderma* y del fitopatógeno en posiciones opuestas y equidistantes (Figura 3). Como testigos se utilizan siembras individuales de cada uno de los aislamientos de *Trichoderma* y del patógeno. Las pruebas se realizan por triplicado. Luego de siete días de incubación a 25° C se evalúa el grado de antagonismo utilizando la escala de Bell *et al.* (1982) (Tabla 1) (CET, 2004).

Tabla 1. Escala de clases de antagonismo.

Clases	Descripción
1	<i>Trichoderma</i> crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo
2	<i>Trichoderma</i> crece al menos sobre dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo
4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de <i>Trichoderma</i>
5	El patógeno crece sobre la colonia de <i>Trichoderma</i> ocupando toda la superficie del medio de cultivo

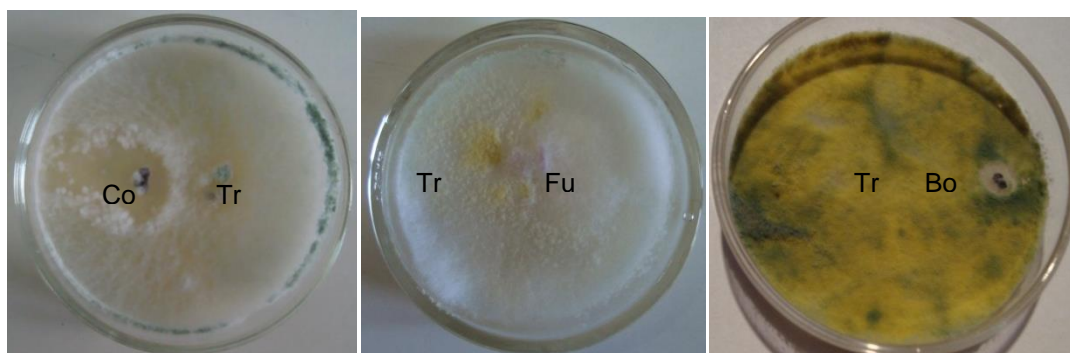


Figura 3. Técnica del cultivo dual, *Trichoderma* (Tr); patógenos: *Colletotrichum* (Co); *Fusarium* (Fu); y *Botrytis* (Bo)

Pruebas de efectividad de *Trichoderma in vivo* en invernáculo y/o campo

Para la realización de estas pruebas se utilizan los aislamientos de *Trichoderma* que muestren grados de antagonismo 1 y 2 en la prueba de cultivo dual. A partir de cultivos puros en APG de los aislamientos seleccionados se preparan suspensiones conidiales en solución salina y se determina la concentración de las mismas utilizando una cámara Neubauer. Luego, se ajusta la concentración a 2×10^8 conidios.

Patógenos de suelo: para evaluar el control de los aislamientos seleccionados sobre este tipo de patógenos se tratan semillas o plantines (Figura 4). El procedimiento consiste en la inmersión de las semillas o raíces de plantines en suspensiones de: i) *Trichoderma*; ii) *Trichoderma* + fitopatógeno; iii) fitopatógeno; y iv) solución salina. El material tratado se siembra en macetas y se realizan observaciones periódicas.

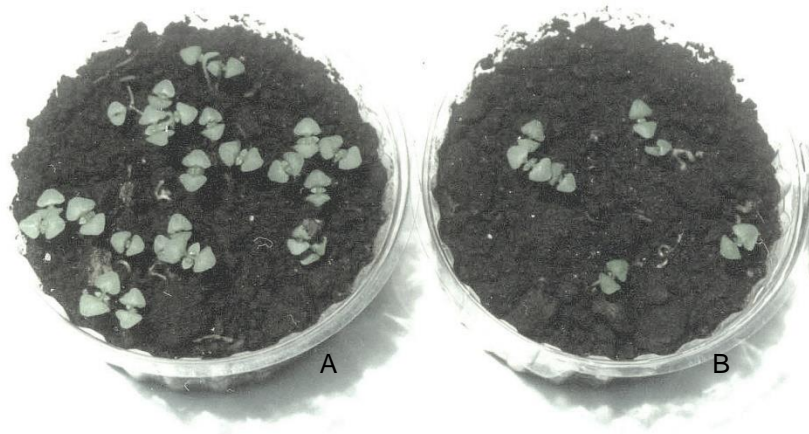


Figura 4. Tratamiento de semillas de albahaca (*Ocimum basilicum*): (A): *Trichoderma* + *Colletotrichum gloesporioides*; (B): *C. gloesporioides*

Patógenos foliares: Se utilizan aspersiones foliares. Los tratamientos son idénticos a los indicados para los patógenos de suelo (Figura 5).



Figura 5. Aspersiones foliares de plantas de albahaca (*Ocimum basilicum*): (A): *Trichoderma* + *C. gloesporioides*; (B): *C. gloesporioides*

En ambos casos las pruebas se realizan por triplicado y la variable respuesta es la incidencia de la enfermedad.

El criterio para la elección de los aislamientos de *Trichoderma* destinados a la producción artesanal es el nivel de antagonismo logrado en las pruebas de efectividad, medido a través de la disminución de la intensidad de la enfermedad en comparación con la intensidad observada en los testigos inoculados con suspensiones del fitopatógeno.

Segunda etapa: producción artesanal de *Trichoderma* spp en sustrato sólido

Preparación y acondicionamiento del sustrato Pueden utilizarse distintos granos de cereales, pseudocereales y salvado que incluyen: amaranto, avena, cebada, maíz y trigo, entre otros (Sivila y Álvarez, 2013; CET, 2014). Si bien, el arroz es el grano más utilizado los productores familiares pueden optar por aquellos que no representen un gasto adicional. En tal sentido, puede evaluarse la utilización de frutos de descarte y otros residuos de cosecha (Sivila y Álvarez, 2013).

Una vez elegido el sustrato, el mismo debe **acondicionarse**. En el caso de granos, el acondicionamiento incluye un paso de pre cocido en agua (Sandoval y Noelting, 2011). El tiempo varía en función del grano utilizado, 5-7 minutos para arroz y pseudocereales y 35-40 para granos. Luego del pre cocido los granos se colocan en bandejas y se dejan orear a temperatura ambiente hasta que estén sueltos. Una vez oreados los granos se colocan en frascos de vidrio o bolsas de polietileno. Los frascos requieren de un lavado previo con agua y detergente, seguido de la inmersión en agua con hipoclorito de sodio y del enjuague con agua. A continuación se colocan en los frascos o bolsas una cantidad de granos precocidos que no debe exceder un tercio de la capacidad de los mismos (Troya y Vaca Granda, 2014). La boca de los frascos debe cubrirse con un tapón de algodón y un capuchón de papel asegurado con hilo, las bolsas de polietileno se cierran con un hilo o cinta de papel (Sivila y Álvarez, 2013). El último paso del acondicionamiento es la esterilización de los frascos o bolsas en autoclave a 121° C durante 10 minutos, o en una olla en baño María 35-40 minutos.

Con los frascos o bolsas esterilizados y enfriados ya puede iniciarse el proceso de siembra. Para lo cual se siembran (inoculan) los frascos o bolsas con un cultivo puro del hongo, a razón de 1 cm² del medio de cultivo colonizado por *Trichoderma* por cada frasco o bolsa.

Los frascos o bolsas inoculadas se colocan en una estufa a 26° C y 12 horas de fotoperíodo durante 8-9 días, cada dos días se agitan suavemente para impedir la formación de grumos y facilitar la colonización del sustrato. En el caso de no contar con una estufa de cultivo, los frascos o bolsas pueden colocarse para su incubación durante 11-12 días en estantes limpios y protegidos de la luz del sol.

Al cabo de 9 días, se eligen los frascos o bolsas donde el sustrato haya sido colonizado totalmente por *Trichoderma*, la colonización se visualiza a través del desarrollo de coloración verde o amarilla, dependiendo de la cepa utilizada, sobre los granos. A partir de este momento el bioproducto estará listo para su aplicación, si se prevé utilizarlo en una o dos semanas se puede conservar en un ambiente fresco, sin luz solar directa, o colocar en la parte baja de la heladera.

En el caso de desear conservar el bioproducto por más tiempo, es necesario proceder al secado y envasado al vacío (Sivila y Álvarez, 2013).

Secado: este proceso se realiza para que los conidios y clamidosporas permanezcan viables durante el almacenamiento.

El contenido de los frascos o bolsas se esparce en bandejas, desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% enjuagadas y secadas. Estas bandejas se llevan a un ambiente con extractor de aire y se pesan diariamente hasta peso constante. Finalmente, el bioproducto colonizado y seco se coloca en bolsas de polietileno selladas al vacío (Sivila y Alvarez, 2013).

El bioproducto puede almacenarse hasta 10-11 meses en oscuridad y temperaturas inferiores a 10° C. Durante este período es necesario realizar pruebas microbiológicas que permitan determinar la calidad del producto.

También puede recurrirse a la molienda del sustrato colonizado utilizando un molino (criba de 0,8 mm). Previa molienda el sustrato colonizado se seca en estufa con circulación de aire forzado a 60° C durante 24 horas, para lograr un contenido de humedad de 5-7%. El polvo obtenido se envasa. Como portadores pueden utilizarse dextrosa anhidra o tierra de diatomeas (CET, 2014).

Control de calidad

La producción de ACB requiere del control adecuado de las propiedades biológicas, físicas y químicas que aseguren al agricultor que el producto posea la máxima eficacia en condiciones de campo (CET, 2014). En tal sentido, las pruebas recomendadas incluyen: i) La determinación del grado de antagonismo utilizando la técnica del cultivo dual;

ii) La determinación de la concentración de conidios. Esta prueba es orientativa para la determinación de la dosis del ACB. Se busca que la concentración de conidios por gramo de producto debe ser igual o mayor a 10^9 en formulaciones sólidas, esta determinación se realiza por conteo directo en una cámara de Neubauer. Para lo cual se parte de diluciones en tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril + 1 gramo del sustrato colonizado, las diluciones deben agitarse convenientemente para su montaje en la cámara ya armada. La cámara de Neubauer se arma colocando en la parte central un cubreobjetos limpio, y seguidamente se llena la cámara con la dilución utilizando una pipeta en un ángulo de 35° en el borde del cubreobjeto. La suspensión debe descargarse suavemente hasta que la zona de carga se llene por capilaridad. Es importante que el llenado resulte homogéneo sin burbujas. Una vez llena la cámara se deja reposar durante 2 minutos para que los conidios precipiten y de esta forma resulte más fácil la visualización y el conteo (Troya y

Vaca Granda, 2014). El recuento de conidios se realiza colocando la cámara en la platina del microscopio. Para visualizar la cámara se utiliza el ocular de 10X, y el de 40X para el conteo de los 25 cuadrados de la cámara. (Troya y Vaca Granda, 2014). Una vez realizado, el conteo en los dos campos de la cámara, se procede a calcular la concentración (C) utilizando la siguiente fórmula:

$$C \text{ (conidios/mm}^3\text{)} = \frac{\text{(conidios contados en los 2 campos)}}{\text{Superficie recontada (mm}^2\text{) x profundidad (m) x dilución}}$$

iii) Viabilidad, se determina a través de pruebas de germinación de conidios utilizando portaobjetos cubiertos con una delgada capa de medio APG (CET, 2014). Sobre estos portaobjetos se depositan 4 gotas de una suspensión del sustrato colonizado, con una concentración de 10^7 - 10^8 conidios/ml. Los portaobjetos sembrados se colocan en cámara húmeda y se incuban a 26° C en oscuridad durante 18-24 horas. Luego, los portaobjetos se observan al microscopio (40X). Se cuentan en total 300 conidios (100 en cada portaobjeto) y se consideran viables si el largo del tubo germinativo es el doble del diámetro del conidio. Si el producto se destina a tratamiento de semillas o plantines la viabilidad puede estar entre el 80 -90% y para aplicaciones foliares debe ser superior al 90% .

iv) Pureza, se procede a la determinación de la proporción de *Trichoderma* en relación a posibles microorganismos contaminantes. La cuantificación se realiza a partir de la preparación de una serie de diluciones del producto de 10 en 10; 0,2 ml de cada dilución se siembran por duplicado en placas con agar malta o APG. Las placas se incuban durante 4 días a 26° C y a continuación se cuenta el número de colonias de *Trichoderma* y de los contaminantes. La proporción entre *Trichoderma* y contaminantes se expresa como porcentaje y los niveles de contaminación no deben exceder el 0,002% (CET, 2014).

Consideraciones finales

Trichoderma posee tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios (Pineda Insuasti *et al.*, 2017), los dos últimos son los más estables y es por este motivo que en la determinación de la viabilidad, una de las pruebas de control de calidad más importantes, se mide la germinación de conidios.

La viabilidad puede ser afectada por la exposición a la radiación solar. La vida media de los conidios expuestos a la radiación solar es de 5-10 días. Por este motivo, se recomienda que las aplicaciones foliares se realicen temprano en la mañana o en horas de la tarde, previo riego para facilitar la germinación (CET, 2014).

Otros factores que inciden en la viabilidad de los conidios son el contenido de humedad y la temperatura de almacenamiento del producto. Cuando el contenido de humedad es

menor al 10%, el polvo de conidios sin formular puede almacenarse a 4° C y mantener altos niveles de viabilidad durante meses (CET, 2014).

La utilización del hongo *Trichoderma* para el manejo de hongos fitopatógenos es una alternativa para lograr aumentos en los rendimientos, la calidad de los cultivos y reducir el impacto negativo que los agroquímicos tienen sobre el medio ambiente.

Bibliografía

Arcia A (1995). Uso de antagonistas en el control de fitopatógenos de suelo. Universidad Centro Occidental, Barquisimeto, Venezuela.

Barnett HL, Hunter BB (1972). Illustrated genera of Imperfecti Fungi. 3rd Edition, Minneapolis: Burgess Publishing Co.

CET (2004). Manual producción y utilización de *Trichoderma* spp. Santiago: Centro de Educación y Tecnología.

Companioni González B, Domínguez Arizmendi G, García Velasco R. (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal* 19(4): 237-248.

Harman GE. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22". *Plant Dis.* 84: 377-393

Martínez B, Infante D, Reyes W. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos". *Rev. Protección Veg.* 28(1):1-11

Pineda Insuasti JA, Benavidez Sotelo EN, Duarte Trujillo AS, Burgos Rada CA, Soto Arroyave SP, Pineda Soto CA, Fierro Ramos FJ, Mora Muñoz ES, Alvarez Ramos SE. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. *ICIDCA* 51(1): 47-52.

Rifai MA (1969). A revisión of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-56

Rincón AM, Codón AC, Benítez T. 2008. Hidrolasas y genes fúngicos de interés en biocontrol. En: Pallás V, Escobar C, Rodríguez PP, Marcos JF (Eds.). *Herramientas biotecnológicas en Fitopatología*. Madrid: Mundi-Prensa.

Samaniego Fernández LM, Harouna M, Corbea O, Rondón Castillo J, Placeres Espinosa I (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos de suelo. *Revista de Protección Vegetal* 33(3): 1-11

Samuels GJ (2006). *Trichoderma*. Sytematics, the sexual stage, and ecology. *Phytopathology* 96: 195-206.

Sandoval MC, Noelting MC (2011). Producción de conidios de *Trichoderma harzianum* Rifai en dos medios de multiplicación. *Fitosanidad* 15(4): 215-221.

Sandoval MC. (2012). Métodos utilizados en el control biológico de patógenos fúngos. Aplicado al caso: control biológico de *Colletotrichum gloesporioides* patógeno del cultivo de albahaca con *Trichoderma*. Saarbrücken: Editorial Académica Española.

Serrano Carreon L, Galindo Fentanes E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*: 77-88.

Sivila N, Alvarez S (2013). Producción artesanal de *Trichoderma*. Tecnologías agroecológicas para la producción familiar. 1º edición. San Salvador de Jujuy:

Torres M, Ortiz C, Bautista C, Ramírez J, Avalos N, Cappello S, 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.

Troya C, Vaca Granda L (2014). Protocolo para la reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp en laboratorios artesanales. Proyecto de Innovación Tecnológica Participativa y Producción Agrícola. Quito: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca-

Vallejo Ilijama MT. (2014) Caracterización y clasificación de *Trichodermas* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal. Tesis de Maestría, Universidad Técnica de Ambato.