


Producción artesanal de *Trichoderma spp.* para posible uso en el control biológico sostenible en huertas
 Artisanal production of *Trichoderma spp.* for possible use in sustainable biological control in orchards

Revista sobre estudios e investigaciones del saber

Alicia Beatriz Albrecht Encina ¹ 

<https://orcid.org/0000-0003-4441-9260>

¹ Universidad Nacional de Itapúa. Dirección de Investigación y Ambiente. Facultad de Ciencias y Tecnología, Encarnación, Paraguay. alicciaa2009@gmail.com

Mónica Liliana Albrecht Encina ² 

<https://orcid.org/0000-0002-3662-9885>

² Universidad Nacional de Itapúa. Facultad de Ciencias y Tecnología, Encarnación, Paraguay. mlalbrecht79@mail.com

Karina Beatriz Morínigo ² 


<https://orcid.org/0000-0002-7941-0234>

² Universidad Nacional de Itapúa. Facultad de Ciencias y Tecnología, Encarnación, Paraguay. grisskari88@gmail.com

Nery Javier Zapata Montes ^{† 3} 

<https://orcid.org/0000-0002-1821-7836>

³ Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico Superior de Tlatlauquitepec, Puebla, México. zapatanery@mail.com

Romina Rebruk ² 

<https://orcid.org/0000-0002-5107-4873>

² Universidad Nacional de Itapúa. Facultad de Ciencias y Tecnología, Encarnación, Paraguay. ing.ambientalrominarebruck@mail.com

Natalia Gisselle Paniagua ² 

<https://orcid.org/0000-0003-2061-4053>

² Universidad Nacional de Itapúa. Facultad de Ciencias y Tecnología, Encarnación, Paraguay. gissellepm98@mail.com

Resumen

El objetivo del trabajo fue la producción artesanal de *Trichoderma spp.* para su posible aplicación en el control biológico sostenible en huertas de zonas urbanas y suburbanas del distrito de Encarnación y Capitán Miranda, Itapúa, año 2021. Tuvo enfoque cuantitativo con diseño no experimental de carácter descriptivo. Se evaluaron parcelas de huertas familiares considerando características del ambiente y espacios temporales para la ejecución de las acciones. El muestreo de hongos consideró su aislamiento y para la siembra se prepararon medios de cultivo PDA. *Trichoderma* posee tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios; los dos últimos son los más estables, motivo por el cual para


la determinación de la viabilidad se evaluó la germinación de conidios, obteniendo valores adecuados. El sustrato (marlo) es apto para la obtención de suspensiones de conidios en concentraciones adecuadas para ser utilizadas en aplicaciones de campo. El contenido de abonos orgánicos en suelo favorece el desarrollo del hongo, situación que se observó en la huerta del distrito de Capitán Miranda. La versatilidad de crecimiento y las bondades que presentan las cepas de *Trichoderma spp.* han hecho posible su utilización para la elaboración de productos biocontroladores fitopatógenos.

Palabras clave: *Trichoderma spp.* Control biológico. Sustrato.

Área del conocimiento: Ciencias naturales

Correo de Correspondencia: alicciaa2009@gmail.com

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

 Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia Creative Commons CC-BY

Fecha de recepción: 13/01/2022

Fecha de Aprobación: 28/07/2022

Página Web: <http://publicaciones.uni.edu.py/index.php/rseisa>

Citación recomendada: Albrecht Encina, A. B.; Albrecht Encina, M. A.; Morínigo, K. B.; Zapata, N.; Rebruk, R.; Paniagua, N. G. (2023). Producción artesanal de *Trichoderma spp.* para posible uso en el control biológico sostenible en huertas. Revista sobre estudios e investigaciones del saber académico (Encarnación), 17(17): e2023006

Abstract

The objective of the study was the artisanal production of *Trichoderma spp.* for its potential application in sustainable biological control in urban and sub-urban gardens in the district of Encarnación and Capitán Miranda, Itapúa during the year 2021. The descriptive study developed a quantitative approach with a non-experimental. Local people garden plots were evaluated considering characteristics of the environment and temporary spaces for the execution of the actions. The sampling of fungi was considered for the isolation and PDA culture media were prepared for sowing. *Trichoderma* has three types of propagules: hyphae, chlamydospores and conidia; the last two are the most stable, which is why conidia germination was evaluated to determine viability, obtaining satisfactory values. The substrate is suitable to generate suspensions of conidia in acceptable concentrations to be used in field applications. The content of organic fertilizers in soil favors the development of the fungus, a condition that was observed in the gardens of the district of Capitán Miranda. The versatility of growth and the benefits that the strains of *Trichoderma spp.* have made promising its use to make phytopathogenic biocontrol products.

Keywords: *Trichoderma spp.* Biological control. Substrate.

Introducción

El género *Trichoderma spp.* es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo con abundante materia orgánica y altas densidades de raíces, que también se puede encontrar asociado a la superficie de plantas (Aceves y Sánchez, 2005; Norte, 2007; Affokpon et al., 2011; Flores et al., 2018) y cortezas de madera descompuesta. Las especies de este género son de gran interés agrícola (horticultura) debido a las características antagónicas que presentan frente a hongos fitopatógenos (Gilchrist et al., 2005; García et al., 2006; Affokpon et al., 2011; Castellano et al., 2011).

Se conoce que aproximadamente el 90 % de los actuales micoplaguicidas para biocontrol de hongos fitopatógenos tiene como principio activo las esporas

(conidios y clamidiosporas) de *Trichoderma spp.* (Flores et al., 2018). La producción de este agente se realiza mediante diferentes métodos, entre ellos los artesanales (Sandoval, 2020). Uno de los sustratos más utilizados para la producción de *Trichoderma spp.* es el arroz, también se reproduce en cebada, amaranto, quinua, maíz y otros (Agamez, 2008; López et al.; 2011, Sivila y Susana, 2013; Martínez et al. 2013; Valdez, 2014; Vallejo, 2014; Flores et al., 2018). Las bondades como agente de control dependen más de las cepas de *Trichoderma*; que de la especie (Navazollah y Navid, 2008; Jiménez y Pantoja, 2012). La producción artesanal de biopreparados fúngicos, para control biológico de plagas, aun no se aborda profundamente. El objetivo de este trabajo fue la producción artesanal de *Trichoderma spp.* para su posible aplicación en el control biológico en huertas de zonas urbanas y sub urbanas del distrito de Encarnación y Capitán Miranda, Itapúa, año 2021.

Materiales y métodos

Muestreo de hongos

Para la siembra de las muestras fueron preparados medios de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar). Se pesó el PDA deshidratado, posteriormente fue agregado en un matraz de 500 mL con agua destilada, luego se procedió a la esterilización del mismo en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se dejó enfriar hasta aproximadamente 30°C, el Cloranfenicol fue añadido como antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes. Se vació la suspensión en placas de Petri en la campana de flujo laminar con los cuidados necesarios para evitar la contaminación. El medio de cultivo reposó hasta solidificar. A partir de raíces de chíca (*Salvia hispánica L*), en el estudio (Albrecht, 2019) de la diversidad micológica asociado a este cultivo, se identificó el hongo en estudio. Se cortaron en pequeñas porciones de la misma, que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2,5% y enjuagadas con agua estéril, luego se depositaron en placas de Petri con PDA (papa dextrosa agar) y se incubaron a una temperatura de 25±2°C durante 5-7 días.

Purificación

El proceso de purificación partió de un solo conidio, porque la finalidad de la aplicación del método se asoció a evitar la mezcla de cepas. Se tocó con un ansa flameado la masa de conidios, logrando así que varios de ellos se adhirieran al material utilizado. Las muestras fueron desprendidas del ansa utilizando entre 4 y 6 gotas agua destilada estéril, para ser depositadas en el medio de cultivo PDA contenido en una placa de Petri. La elección del conidio germinado concluyó con el traslado del mismo a una placa de Petri para la incubación a 24 °C durante 10 días (Castellano, Jara, & Mosquera, 2011).

Preparación de sustrato

Según técnica de Benites (2013) se trituró el sustrato (marlo) hasta obtener partículas de 5mm de diámetro, se esterilizó 200 gramos en bolsas individuales de polipropileno esterilizable con autoclave (121°C, 1atm por 15 min.). Posteriormente, a la temperatura ambiente, se le agregó 40mL de agua destilada de tal forma que el sustrato quedó húmedo. Se procedió a la inoculación del sustrato esterilizado con 20 mL de *Trichoderma spp.*, para lo cual se utilizó una jeringa esterilizada, mechero, colocando un muelle o un callo para facilitar el manejo del medio de cultivo dónde se aplicó y distribuyó en un total de 20 bolsas. Se dejaron incubar por 7 días, agitando diariamente a partir de las 72 horas para oxigenarlas, alternando periodos de luz y oscuridad. Trascorrido este tiempo, se procedió a la aplicación del sustrato en huertas de zonas urbanas y sub urbanas del distrito de Encarnación y Capitán Miranda.

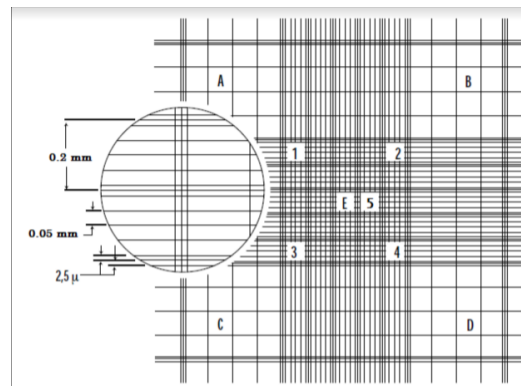
Cálculo de la concentración del inóculo

Un paso fundamental es colocar las esporas del hongo en agua, se debe raspar los cultivos del hongo en las placas y mezclar este raspado con un volumen conocido de agua destilada. Una vez homogeneizada, la suspensión se filtra a través de una malla o gasa para eliminar el agar o restos de micelio que podrían obstruir el paso de la suspensión a través del aspersor durante la inoculación, y se lleva a un volumen conocido. Paso a seguir, tomar una gota con una pipeta Pasteur y colocarla en el centro de la cámara de Neubauer; enseguida colocar el cubreobjetos cuidando que no queden burbujas y que la gota no se derrame ni se salga de los campos de conteo. Esto

daría un dato erróneo, ya que el excedente arrastraría las esporas. La cámara consta de dos campos de conteo, cada uno con nueve cuadros que, a su vez, están divididos en cuadros más pequeños. Tanto los cuadros grandes como los pequeños tienen dimensiones conocidas, de tal modo que por medio de fórmulas se puede obtener el número de esporas por mL (Gilchrist, y otros, 2005).

Figura 1.

Cuadro de conteo



Cuadro de conteo

El campo de conteo que se debe utilizar depende del tamaño de los conidios del hongo con el que se esté trabajando. Si éstos son grandes, lo más conveniente es contar en los cuatro cuadros de las esquinas (A, B, C, D) más el cuadro del centro (E). El conteo se repite por lo menos seis veces y se saca un promedio (Gilchrist, y otros, 2005). Con los datos obtenidos, se calcula un valor de la media; éste se multiplica por una constante que depende de la cámara que se utilice. De ese producto se obtendrá la concentración en conidios/mL. La concentración corresponde a la de la suspensión inicial. Cuando se desea calcular una dilución determinada, se aplica la fórmula siguiente:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

C1 = Concentración inicial (conocida en el conteo)

V1 = Volumen inicial (establecido arbitrariamente al preparar el inóculo)

C2 = Concentración final deseada (según el estudio a realizar)

V2 = Volumen final (desconocido)

Despejando:

$$V_2 = \frac{C_1 \times V_1}{C_2}$$

Recuento de colonias

Seleccionar las placas que presentan menos de 150 colonias, al nivel de dos diluciones sucesivas. Contar las colonias de las placas seleccionadas. Calcular el número de Unidades Formadoras de Colonias por gramo o mililitro, según la siguiente expresión:

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

N: Número de Unidades formadoras de Colonia por gramo o mililitro

ΣC : Suma de todas las colonias contadas en todas las placas retenidas de dos diluciones sucesivas.

V: Volumen del inóculo aplicado a cada placa, en mililitros.

n_1 : Número de placas retenidas en la primera dilución

n_2 : Número de placas retenidas en la segunda dilución

d: Nivel de dilución correspondiente a la primera dilución retenida (Covacevich & Consolo, 2014).

Descripción del área de investigación

Los ensayos se realizaron en las localidades de Capitán Miranda y Encarnación, que se caracterizan por suelos arcillosos (Quiñónez Vera, 2019), temperatura y humedad promedio de 29 °C y 60% (Dirección de Meteorología e Hidrología, 2020).

Figura 2.

Punto de muestreo 1 en Encarnación

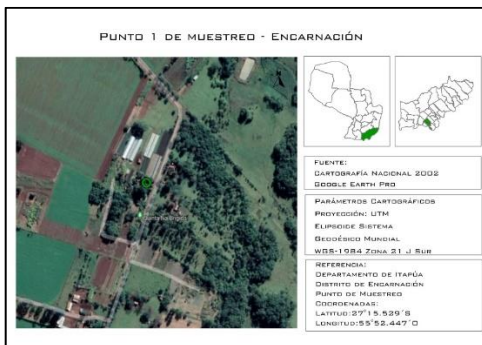


Figura 3.

Punto de muestreo 2 en Encarnación

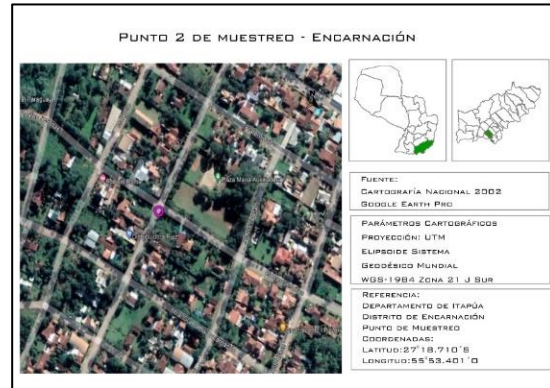
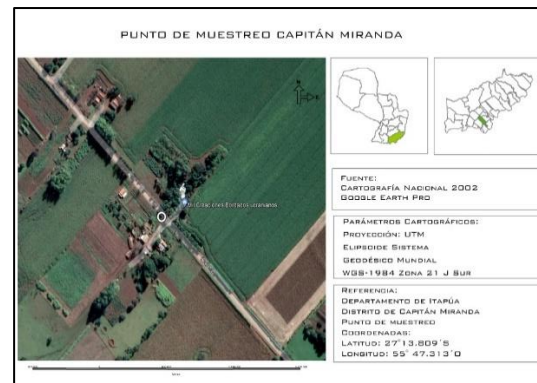


Figura 4.

Punto de muestreo en Capitán Miranda



Inoculación de suelo

Para cada unidad experimental se utilizó parcelas de 3m de largo por 1,5m de ancho, (4,5 m²). La aplicación del sustrato inoculado en suelos sin cultivos, se realizó en surcos de 5cm de profundidad con una distancia entre los mismos de 15cm, utilizando una dosis ajustada a una concentración de conidios de $1,1 \times 10^7$ UFC. Según Ávila et al (2017) con la aplicación de *Trichoderma harzianum* de concentraciones mayores de 6 y 8×10^{10} UFC en pre-siembra se obtuvo menor incidencia de plantas enfermas.

Transcurrido los 45 días después de la aplicación del sustrato inoculado en las parcelas se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro.

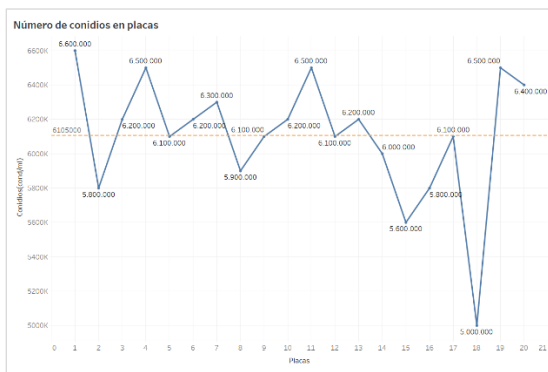
Se procedió a extraer muestras de suelo con una pala limpia, a una profundidad de 10-20 cm de la zona inoculada de aproximadamente 500 g, las que fueron depositadas en un recipiente plástico, etiquetados debidamente para su respectivo procesamiento.

Una vez colectadas las muestras, se homogeneizó 10 g de suelo en 90 mL de agua destilada estéril y se agitaron por 30 minutos, posteriormente se extrajo una alícuota de 1 mL diluyendo en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril. Se tomó 1 mL de la dilución y fue depositada en el medio de cultivo selectivo para *Trichoderma spp.* Se incubó a temperatura ambiente (aproximadamente 1 semana) hasta que se observó el desarrollo de colonias fúngicas de color verdoso, luego se transfirió (axénicamente) las colonias presentes a medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), hasta su esporulación, aproximadamente 5-8 días a 22 ± 4 °C. Y se realizó el recuento (UFC/mL).

Resultados y discusión

Aislamiento y crecimiento de *Trichoderma spp* en medio de cultivo PDA.

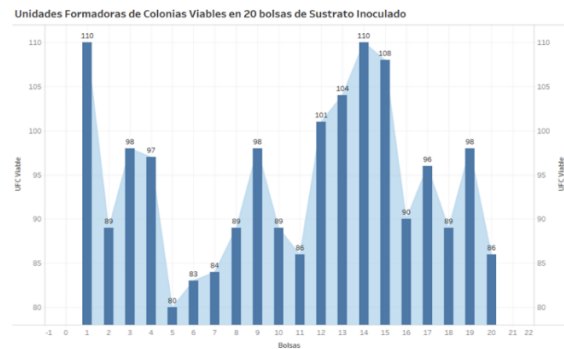
Figura 5.
Número de conidios



A partir de los cultivos aislados y purificados obtenidos de la raíz de chía (*Salvia hispánica L*) se obtuvo un promedio de 6105000 conidios por mL, notándose su crecimiento en las placas de Petri que evidencia su fácil desarrollo en medios de cultivo que pueden ser utilizados como fuente de inoculo para su masificación (Sandoval & Belesansky, 2020).

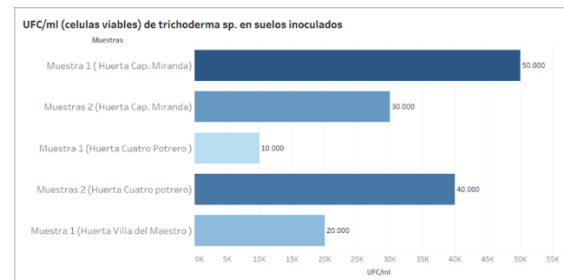
Conidios Viables

Figura 6.
Unidades formadoras de Colonias viables en 20 bolsas de sustrato inoculado



Las unidades formadoras de colonias viables (UFC) de un total de 20 bolsas analizadas, las bolsas número 1 y 14 presentaron crecimiento en un valor de $1,1 \times 10^7$ UFC/mL, siendo estas las de mayor crecimiento en sustrato (marlo) inoculado, mientras que en las bolsas número 5, 6 y 7 presentaron menor crecimiento. El marlo reúne las condiciones para la obtención de concentraciones de conidios adecuadas para ser utilizadas en aplicaciones de campo (Cooney et al., 1997; Nugra, 2018).

Figura 7.
UFC/mL (células viables) de *Trichoderma spp.* en suelos inoculados



Se observa que después de 45 días de la aplicación en suelo del sustrato inoculado se evidencia la cantidad de *Trichoderma spp.* con mayor valor en la muestra 1 situado en el distrito de Capitán Miranda 5.10^5 UFC/mL, seguido por la muestra 2 de la parcela perteneciente al distrito de Encarnación – Cuatro Potrero con un valor de 4.10^5 UFC/mL

Conclusión

A causa de que los conidios son uno de los propágulos más estables del *Trichoderma spp* en la determinación de su viabilidad se midió la germinación, en la cual se pudo evidenciar que el promedio obtenido de la concentración 6105000 conidios por mL, fue el adecuado, a partir de los cultivos aislados y purificados obtenidos de la raíz de chía (*Salvia hispánica L*).

El sustrato de maíz (marlo) se considera apto para el desarrollo del hongo, debido a un favorable resultado en el crecimiento de *Trichoderma spp* con valor de $1,1 \times 10^7$ UFC/mL.

Luego de 45 días de la aplicación del inoculo con el sustrato (marlo) se observó una importante colonización del hongo en el suelo, la concentración del mismo para la parcela del distrito de Capitán Miranda fue de 5.10^5 UFC/mL.

Es importante la utilización de cepas nativas que ya están adaptadas a las condiciones edafoclimáticas y edafológicas de la región, por lo que el crecimiento en el sustrato y su proliferación en el suelo hacen que sea factible su producción artesanal.

Bibliografía

Affokpon, A., Coyne, D. L., Htay, C. C., Agbèdè, R. D., Lawouin, L., & Coosemans, J. (2011). Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against rootknot nematodes in West African vegetable production systems.

Agamez, E., Zapata, R., Oviedo, L., & Barrera, J. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp.* *Revista Colombiana de Biotecnología*, 23-34. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/776/77610204.pdf>

Albrecht, A. (2019). *Diversidad Micológica del cultivo de Chía (Salvia hispánica L) en fincas rurales de Itapúa y Misiones, Paraguay*. Encarnación.

Ávila, F., Molina, L., & Garcés, F. (2017). *Trichoderma harzianum* en pre-transplante aumenta el potencial agronómico del cultivo de piña. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 411 - 414.

Benites, C., & Marroquín, L. (2013). Producción de *Trichoderma Harzianum* en diferentes sustratos. *Revista Portal de la Ciencia*, 68-74.

Bulluck III, L., Brosius, M., Evanylo, G., & Ristaino, J. B. (2002). Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. *Applied Soil Ecology*, 147-160.

Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima: Centro Internacional de la Papa (CIP).

Castellano, G., Jara, C., & Mosquera, G. (2011). Guías de prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 7-8.

Cooney, J., Lauren, D., Jensen, D., & Perry-Meyer, L. (1997). Effect of solid substrate, liquid supplement, and harvest time on 6-n-pentyl-2h-pyran-2-one (6PAP) production by *Trichoderma spp.* *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 531-534.

Covacevich, F., & Consolo, F. (2014). *Herramientas para el estudio y manipulación de Hongos Micorrízicos Arbusculares y Trichoderma*.

Dirección de Meteorología e Hidrología. (2020). *Boletín de Perspectivas Climáticas*.

Flores, E., Huanca, G., Onofre, X., Jiménez, P., Torrez, M., Guarachi, H., . . . Fernández, C. (2018). Producción de *Trichoderma spp*, en diferentes sustratos. *Revista Estudiantil AGRO - VET*, 220-224. Retrieved from <http://www.ojs.agro.umsa.bo/index.php/AGV/article/view/308/298>

- García, R., Riera, R., Zambrano, C., & Gutiérrez, L. (2006). Desarrollo de un fungicida biológico a base de una cepa del hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de la región andina venezolana. *Fitosanidad*, 115-121. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116102005.pdf>
- Gilchrist, G., Fuentes, G., Martínez, C., Lopez, R. D., Singh, R., Henry, M., & García, I. (2005). *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*.
- González, M., Castellanos, G., Ramos, F., & Pérez, G. (2005). *Efectividad de Trichoderma spp. para el control de hongos patógenos de la semilla y el suelo en el cultivo del frijol*. *Fitosanidad*.
- Jiménez, P. E., & Pantoja, V. E. (2012). *Diseño y construcción de un fermentador rotatorio de fase sólida para la multiplicación del hongo Trichoderma sp.* Riobamba.
- López, M., Ros, A., J., & P. (2011). Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. *Biological Control*, 59-66.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal*, 1-11.
- Michel, A., Otero, M., Martínez, R., Rodríguez, N., Ariza, R., & Barrios, A. (2008). Producción Masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *REVISTA CHAPINGO SERIE HORTICULTURA*, vol. 14 - ISSN: 1027-152X, 185-191.
- Navazollah, S., & Navid, H. (2008). Control biológico del nematodo agallador *Meloidogyne javanica* por *Trichoderma harzianum*.
- Norte, A. (2007). "Trichoderma". *Revista digital SpainsBonsai.com*.
- Nugra Sánchez, A. N. (2018). *Evaluación de sustratos de orgánicos para la propagación del Trichoderma spp.* Quito.
- Pineda, J., Benavides, E., Duarte, A., Burgos, C., Soto, C., Pineda, C., . . . Álvarez, S. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma spp.*: una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47-52.
- Pocasangre, L., Donaldo, M., Zum, F. A., Riversos, A., Rosales, F., & Sikora, R. (2006). *Hongos endofíticos como agentes biológicos de control de fitonematodos en banano*. XVII Reuniao Internacional de Associação para a Cooperacaonas Pesquisas sobre banano no Caribe na América Tropical.
- Quiñónez Vera, L. R. (2019). *Dinámica de Fósforo bajo diferentes sistemas de manejo de suelo*. San Lorenzo.
- Sandoval, M. C., & Belesansky, C. (2020). Producción artesanal del hongo antagonico *Trichoderma Persoon* en sustrato sólido. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental*, 55-64.
- Sivila, N., & Susana, A. (2013). Producción Artesanal de *Trichoderma*. *Universidad de Jujuy*, 10-45. Retrieved from https://www.academia.edu/download/36914956/Manual_de_Trichoderma_2013_CE_DAF_Jujuy.pdf
- Valdés, E. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. *Agroecosistemas*, 254-264. Retrieved from <https://aes.ucf.edu/cu/index.php/aes/article/view/40>
- Vargas, H., & Gilchrist, E. (2015). Biodisponibilidad de *Trichoderma asperellum* en el tiempo en suelo Andisol en condiciones de laboratorio y campo. *Revista Lasallista de investigación*, 72-80.

Albrecht Encina, A. B.; Albrecht Encina, M. A.; Morínigo, K. B.; Zapata, N.; Rebruk, R.; Paniagua, N. G. Producción artesanal de *Trichoderma spp.* para posible uso en el control biológico sostenible en huertas

Vásquez, J. (2010). *Caracterización microbiológica y producción de Trichoderma Harzianum y Trichoderma Viride en cultivo artesanal - Tesis*. Bogotá, D.C.: Pontificia Universidad Javeriana.