



SEP
SECRETARÍA
DE EDUCACIÓN
PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes



División de Estudios de Posgrado e Investigación
Maestría en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria

**Producción de esporas de *Trichoderma viride* utilizando
diferentes sustratos agrícolas**

Tesis que presenta:
Ada Laura Martínez González

Como requisito parcial para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria



El Llano, Aguascalientes, Agosto del 2021



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico El Llano agascalientes



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGROPECUARIA (000780)

ACTA DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

El Llano Agascalientes a 20 de Agosto de 2021

C. Silvia Flores Benítez
Jefa de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación del ITEL
P R E S E N T E

Los suscritos integrantes de Comité Tutoral de la C. Ada Laura Martínez González, con Número de control: M18900310, quien realizó la Tesis: "Producción de esporas de *Trichoderma viride* utilizando diferentes sustratos agrícolas", y con fundamento en los Lineamientos del Posgrado del TecNM, nos permitimos emitir el VOTO APROBATORIO, para que pueda proceder a imprimir, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular le remitimos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Terra Rica, Sapientia Nostra, Homo Superior Est"

Vo. Bo.

Dr. Luis Lorenzo Valera Montero
Director de Tesis

Asesores

Dra. Silvia Flores Benítez

Dr. Catarino Perales Segovia

c.c.p. Estudiante de Maestría
c.c.p. Coordinación del Programa de Maestría

Km. 18 Carretera Ags.-S.L.P., El Llano Agascalientes, C.P. 20330, El Llano, Ags.
Tel. (449) 962-11-00 Ext. 212, e-mail: depi_llano@tecnm.mx
www.llano.tecnm.mx

1

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de El Llano, Aguascalientes el día 20 de agosto del año 2021, la que suscribe, C. Ada Laura Martínez González, alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agropecuaria con número de control M18900310, adscrito al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, manifiesta ser autor del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Luis Lorenzo Valera Montero y cede los derechos del trabajo titulado "Producción de esporas de *Trichoderma viride* utilizando diferentes sustratos agrícolas" y de patentes y beneficios que puedan originarse del presente, al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes,

ATENTAMENTE



Ada Laura Martínez González

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme tener y disfrutar a mi familia y por estar conmigo en cada paso que doy.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de esta investigación.

Al Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes por prestarme las instalaciones para poder llevar a cabo la realización de esta investigación.

Quiero de manera especial agradecer al Dr. Luis Lorenzo Valera Montero por confiar en mí, en base a su experiencia y sabiduría ha sabido direccionar mis conocimientos por su gran apoyo y motivación para la culminación de la Maestría y la elaboración de esta tesis; a la Dra. Silvia Flores Benítez y al Dr. Catarino Perales Segovia por su apoyo por compartir sus conocimientos y guiarme en el proceso de la presente tesis.

A mis maestros, por enseñarme todo lo que sé y más que eso, guiarme para ser una mejor persona y profesional.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con tanto amor a toda mi familia a mis padres Julia González Gutiérrez y Felipe Martínez Vite por apoyarme en cada decisión y proyecto; por siempre impulsarme a ser mejor y lograr con éxito mi carrera.

A mis hermanas Fanny Jazmín Martínez González, Itztli Xóchitl Martínez González y Naydelin Martínez González. Gracias por creer en mí y gracias a Dios por permitirme vivir y disfrutar cada día. No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos

A mis sobrinos Krishna Belén, Danna Sofía y Mario Jaret por ser mi motivo de alegría

SÍMBOLOS Y NOMENCLATURAS

Grados centígrados	°C
Gramo	g
Hora	h
Litro	L
Mililitros	mL
Minutos	min
Porcentaje	%

RESUMEN

Trichoderma viride se emplea ampliamente en la lucha contra hongos del suelo con muy buenos resultados ya que no deja residuos tóxicos. Por esta razón la utilización del control biológico es una alternativa de manejo de enfermedades que causan daños a los cultivos. El objetivo de este trabajo es establecer un sistema de producción de esporas de *Trichoderma viride* utilizando diferentes sustratos y condiciones de incubación.

Para la elaboración de las matrices sólidas se utilizaron como ingredientes maíz quebrado, garbanzo, trigo, sorgo, arroz, gandul, cáscara de frijol y mezclas de los mismos. En bolsa conteniendo 500g, éstos ingredientes se esterilizaron e inocularon con suspensión de *Trichoderma viride* incubando durante 15 días. Para seleccionar el mejor sustrato se evaluó el número de esporas por gramo de sustrato. Esto mediante un Diseño completamente al azar, con seis repeticiones. La matriz más apropiada para el crecimiento del hongo fue la elaborada con maíz quebrado y cáscara de frijol dando como resultado una cobertura del 90 y 100 % de crecimiento de *Trichoderma* sobre la matriz en un lapso de 10 días, con contenidos de esporas $>1 \times 10^8$ por gramo, estimadas mediante cálculo de UFC ($p < 0.05$). Se obtuvieron respuestas favorables para la producción de esporas en matriz sólida de maíz quebrado. Por su parte, la cáscara de frijol también dio buen resultado, por lo que se mezcló con las semillas de maíz quebrado. Esto significa que se cumplió el objetivo de producir esporas de *Trichoderma viride* en cantidades $>1 \times 10^8$ (UFC/g).

ABSTRACT

Trichoderma viride is widely used against soil fungi responsible of plant disease with very good results since no toxic residues are involved, and therefore, is friendly to the environment. For this reason, biological control is a new alternative for managing diseases that cause damage to crops. Thus, the objective of this work is to establish a large-scale production system for *Trichoderma viride* spores using different solid substrates under sterile incubation conditions. For the elaboration of the solid matrices, cracked corn, chickpea, wheat, sorghum, rice, pigeon pea, dried bean husk and mixtures thereof were used as ingredients. These ingredients were placed in bags containing 500g, in order to be sterilized. Later, bags were inoculated with *Trichoderma viride* suspension, incubating for 15 days. After that, the number of spores per gram of substrate was evaluated. This was evaluated using a completely randomized design, with six repetitions. The most appropriate matrix for the growth of the fungus was the one made with cracked corn and bean husks, resulting in a coverage of 90 and 100% growth of *Trichoderma* on the matrix in a span of 10 days, with spore contents $>1 \times 10^8$ per gram, estimated through CFU calculation ($p < 0.05$).

Favorable responses were obtained for the production of spores in a solid matrix that includes broken corn, in agreement with previous work. Bean husks also gave a good result when mixed with the broken corn seeds. This means that the goal of producing *Trichoderma viride* spores in amounts $>1 \times 10^8$ (CFU/g) was met. This methodology can be used by farmers for large scale spore production in average farm facilities

ÍNDICE GENERAL

	Página
ACTA DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN	ii
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
SIMBOLOS Y NOMENCLATURA	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INDICE GENERAL	ix
INDICE DE CUADROS	xii
INDICE DE FIGURAS	xiii
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo general	2
2.1 Objetivos específicos	2
III. HIPOTESIS	3
IV. REVISION DE LITERATURA	4
4.1 Características de <i>Trichoderma viride</i>	4
4.2 Factores que influyen el crecimiento de <i>Trichoderma</i>	7
4.2.1 Temperatura	7
4.2.2 pH	8
4.2.3 Luminosidad	8
4.2.4 Necesidades nutricionales de <i>Trichoderma viride</i>	8
4.3 Control biológico	9
4.4 Mecanismos de acción directos de <i>Trichoderma viride</i> como agente de biocontrol.	10
4.4.1 Competencia por espacio y nutrientes	10
4.4.2 Antibiosis	11
4.4.3 Micoparasitismo	12
4.5 Mecanismos de acción indirectos de <i>Trichoderma viride</i> como agente de biocontrol	13

4.5.1 Efecto promotor del crecimiento en plantas	13
4.5.2 Solubilización de nutrientes minerales	14
4.5.3 Inducción de resistencia	14
4.5.4 Resistencia sistémica inducida	15
4.6 Sustratos que se utilizan para la producción de <i>Trichoderma viride</i>	15
4.7 Evaluación de sustratos a partir de semillas y residuos orgánicos	16
4.8 Estudios realizados de sustratos orgánicos para propagación de <i>Trichoderma</i>	16
V. MATERIALES Y METODOS	18
5.1 Ubicación del sitio de estudio	18
5.2 Actividades preliminares	18
5.2.1 Obtención de las cepas	18
5.2.2 Conservación de las cepas	18
5.2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma viride</i>	19
5.2.3.1 Preparación del medio de cultivo (PDA)	19
5.2.3.2. Procedimiento de resiembra en el medio de cultivo PDA	19
5.2.4 Preparación de los sustratos	19
5.2.4.1 Siembra de <i>Trichoderma viride</i> en sustratos agrícolas	20
5.3 Experimentos para la evaluación de los sustratos	23
5.3.1 Experimento para evaluar los sustratos de arroz frijol y gandul y rastrojos	23
5.3.2 Experimento para evaluar los sustratos de maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo.	24
5.3.3 Experimentos para evaluar los mejores sustratos	25
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.1 Resultados de los estudios preliminares	26
6.2 Resultados del experimento para evaluar los sustratos de arroz, frijol y gandul y rastrojos	27
6.3 Resultados del experimento para evaluar los sustratos de maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo	31
6.4. Resultados de la evaluación de los mejores sustratos para la producción de <i>Trichoderma viride</i>	34

VII. CONCLUSIONES	38
VIII. LITERATURA CITADA	39

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro		
1	Tratamientos del primer experimento para determinar la producción de esporas de <i>Trichoderma viride</i> en condiciones de laboratorio.	24
2	Tratamientos del segundo experimento para determinar la producción de esporas de <i>Trichoderma viride</i> en condiciones de laboratorio.	25
3	Comparación de promedios en los tratamientos	35

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figuras		
1	Hongo <i>Trichoderma viride</i> .	5
2	Fiálide, conidio y conidióforo de <i>Trichoderma viride</i> .	6
3	<i>Trichoderma viride</i> cultivado <i>in vitro</i> . a) Esporulación sobre medio PDA. b-d) Pústulas. e-i) Conidióforo. j-l) Conidias.	9
4	Inhibición del crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> por <i>Trichoderma viride</i> .	11
5	Inhibición del crecimiento de <i>Rhizoctonia solani</i> por gliotoxina producida por <i>Trichoderma viride</i> .	12
6	Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> : a) Crecimiento en respuesta a estímulos de la hifa del hospedero, b) Reconocimiento mediante lectinas específicas y c) Adhesión o enrollamiento y penetración al hospedero mediante la producción de enzimas quitinolíticas.	13
7	Ubicación geográfica de las instalaciones del ITEL, donde se realizó el trabajo de investigación.	18
8	Sustratos orgánicos: arroz, frijol y gandul y rastrojos.	20
9	Sustratos orgánicos: maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo.	20
10	Preparación de la suspensión de <i>Trichoderma viride</i> .	21
11	Siembra de <i>Trichoderma viride</i> en sustratos: arroz frijol y gandul y rastrojos.	21
12	Siembra de <i>Trichoderma viride</i> en sustratos: maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo.	22
13	Inoculación e incubación de <i>Trichoderma viride</i> : arroz frijol y gandul y rastrojos.	22
14	Inoculación e incubación de <i>Trichoderma viride</i> : maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo.	23
15	Dilución de esporas de <i>Trichoderma viride</i> .	25
16	Conservación de cepa de <i>Trichoderma viride</i> en medio de cultivo PDA.	26

17	Resiembra y esporulación en PDA de <i>Trichoderma viride</i> .	27
18	Seis días de crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> en arroz y cascara de frijol.	27
19	Nueve días de crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> en arroz y cascara de frijol.	28
20	Doce días de crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> en arroz y cascara de frijol.	28
21	Quince días de crecimiento de <i>Trichoderma viride</i> en arroz y cascara de frijol.	29
22	Evolución del crecimiento de micelio de <i>Trichoderma viride</i> en ocho matrices preparadas con semillas y rastrojos ($p < 0.05$).	30
23	Concentración de esporas.	31
24	Esporulación de <i>Trichoderma viride</i> en sustratos de: a) maíz, b) sorgo, c) trigo.	32
25	Evolución del crecimiento de micelio de <i>Trichoderma viride</i> en cinco matrices preparadas con semillas	33
26	Concentración de esporas / g.	34

I. INTRODUCCION

Trichoderma viride es un hongo anaeróbico facultativo que naturalmente se encuentra en diferentes hábitats, especialmente los que contienen una buena cantidad de materia orgánica. Algunas de sus especies tienen la habilidad de producir enzimas que atacan o inhiben a hongos fitopatógenos, que lo hacen un excelente agente de control biológico [1].

Las enfermedades producidas por fitopatógenos constituyen la mayor causa de pérdidas en la producción agrícola [2]. Dentro de los principales grupos de hongos fitopatógenos que originan -pérdidas a nivel económico se encuentran: *Phytophthora*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* entre otros, que afectan muchos cultivos de interés comercial como maíz, cebolla, tomate, frijol, trigo, etc. Estas enfermedades han aumentado durante los últimos años debido a las prácticas agrícolas; principalmente por el uso indiscriminado de plaguicidas contra fitopatógenos del suelo, provocando resistencia, contaminación y toxicidad [3].

Las exigencias de la agricultura moderna ocasionan malas prácticas. Sin embargo, el aumento de la conciencia social que se tiene ante el enorme deterioro medioambiental que provoca la utilización indiscriminada de estos compuestos químicos, ha provocado un gran interés en la búsqueda de alternativas que sean amigables con el medio ambiente para el control de plagas y enfermedades [4].

Por lo anterior, se busca elaborar estrategias para reducir el uso de plaguicidas y mejorar los suelos. Entre ellas se encuentra la adición de organismos benéficos como es caso del hongo *Trichoderma viride*.

Con base en la problemática presentada, la finalidad de este trabajo de investigación es encontrar un sustrato económico y de fácil adquisición, en el cual *Trichoderma viride* tenga un buen desarrollo y una elevada producción de esporas viables y establecer una metodología que pueda ser utilizada por los productores para llevarse a gran escala en condiciones de campo.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Establecer un sistema de producción de esporas del hongo *Trichoderma viride* con diferentes sustratos agrícolas y condiciones de incubación.

2.1 Objetivos específicos:

- Evaluar la producción de esporas de *Trichoderma viride* sobre matriz sólida compuesta por semillas de bajo costo.
- Determinar el tiempo óptimo de incubación para la máxima producción de esporas de *Trichoderma viride*.

III. HIPÓTESIS

- Los sustratos agrícolas compuestos por semillas y rastrojos son adecuados para la obtención de esporas de *Trichoderma viride*

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

El género *Trichoderma spp.* es un grupo de microorganismos que habitan naturalmente en un número importante de suelos agrícolas, con abundante materia orgánica en descomposición y altas densidades de raíces. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de otros hongos que atacan a los cultivos. *Trichoderma viride* se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, además, se suelen hallar asociados a la superficie de plantas y cortezas de madera descompuesta de diferentes zonas y hábitats. El hongo *Trichoderma viride* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y esporas (conidias). Tienen una pared celular compuesta por quitina, de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono [1, 2].

La presencia de *Trichoderma spp.* en los suelos agrícolas y naturales en todo el mundo es una evidencia de ser un excelente competidor por el espacio, recursos nutricionales y plasticidad ecológica. *Trichoderma* compite por nutrientes principalmente carbono, nitrato y hierro. Entre las cualidades que favorecen la competencia de este hongo antagonista se encuentran la alta velocidad de desarrollo que posee gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en bloquear el paso al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista [3].

4.1 Características de *Trichoderma viride*

El género *Trichoderma spp.* es un grupo de microorganismos que habitan naturalmente la mayor parte de los suelos agrícolas, sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, así como en residuos de cultivos. Los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos [4].

Su desarrollo se ve favorecido gracias a la presencia de grandes cantidades de raíces a las cuales protege y coloniza rápidamente. Por otro lado, las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que con el paso de los días se torna a verde oscuro, esto como consecuencia de una gran esporulación [5].

Para su aislamiento e identificación en cultivo *in vitro* se consideran características macroscópicas entre las que se encuentran: crecimiento de micelio con la presencia de anillos blancos, amarillos y verdes, mientras que el reverso de las colonias es usualmente amarillo, o incoloro; así mismo, generan una gran cantidad de esporas como se puede observar en la Figura 1 [6].

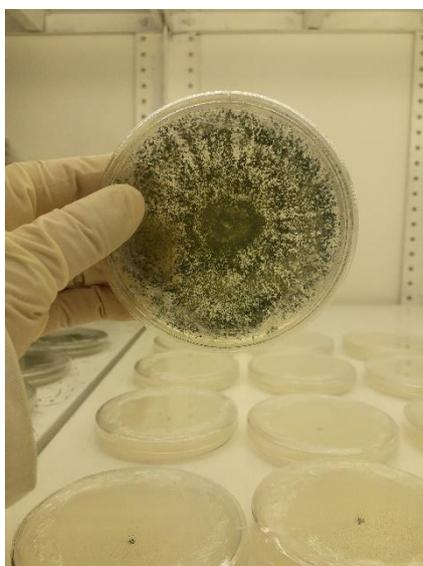


Figura 1. Hongo *Trichoderma viride*.

Entre las características microscópicas que ayudan a identificar especies de este género, está la presencia de conidióforos hialinos, ramificación principal con estructura en forma de pirámide y se encuentran de forma simple o en grupos; hifas lisas, hialinas y septadas como se muestra en la Figura 2. Las condiciones óptimas para su crecimiento son: temperatura, en un intervalo entre 25 – 35 °C, siendo la óptima 25 °C; humedad relativa, del 20 al 80 %, con un óptimo de 70 % y pH; de 6 a 6.5 [7, 8].

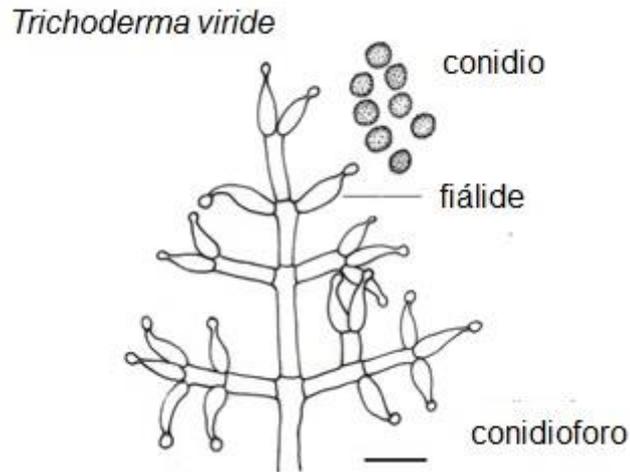


Figura 2. Fiálide, conidio y conidióforo de *Trichoderma viride*.

Uno de los organismos biocontroladores más popular para controlar patologías ejecutadas por patógenos del suelo es el hongo mico parásito *Trichoderma viride* entre las propiedades más relevantes de este hongo se encuentran las siguientes [9, 10]

- ❖ Está de forma natural en un número fundamental de suelos agrícolas.
- ❖ Se puede hallar en diferentes regiones y hábitats, en especial donde existe materia orgánica o desperdicios vegetales en descomposición, de esta forma, como en residuos de cultivos.
- ❖ Su desarrollo se ve favorecido por la existencia de altas densidades de raíces las cuales coloniza velozmente.
- ❖ *Trichoderma* es un hongo anaerobio facultativo.
- ❖ La mayor parte de las colonias de *Trichoderma* en su inicio poseen color blanco, luego se toma a verde oscuro amarillento, como resultado de una densa esporulación.

- ❖ Las esporas son las más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol. *Trichoderma* es el primordial producto a obtener en la producción comercial y/o artesanal.
- ❖ Es capaz de degradar sustratos bastante complicados como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos para su desarrollo gracias al gran complejo enzimático que tiene (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras).
- ❖ *Trichoderma* es un hongo con una alta capacidad de soportar un extenso rango de temperaturas, presentando una amplia repartición ecológica.
- ❖ Los valores óptimos para su desarrollo y esporulación oscilan cerca de los 25 °C, un elemento fundamental a considerar a lo largo de la multiplicación es la conveniencia de períodos alternados de luz y oscuridad, que favorezcan la colonización del hongo sobre diferentes sustratos firmes.

4.2 Factores que influyen el crecimiento de *Trichoderma*

Los principales factores que influyen para un buen crecimiento de *Trichoderma* son:

4.2.1 Temperatura

Es un factor importante que influye en la velocidad de crecimiento de estos microorganismos, la temperatura óptima de crecimiento de *Trichoderma* es diferente para cada especie; sin embargo, al igual que la gran mayoría de hongos, estos se desarrollarán en rangos de temperatura entre 10 y 40 °C, pero en la mayoría de los casos, la temperatura óptima se encuentra entre 25 y 30 °C [11, 12].

4.2.2 pH

El pH juega un papel importante en la regulación de la producción de enzimas extracelulares. La mayoría de cepas de *Trichoderma* tienen la habilidad de crecer en un amplio rango de pH de 6 y 6.5 [13].

4.2.3 Luminosidad

La mayoría especies del género *Trichoderma* son fotosensibles, esporulando rápidamente sobre sustratos naturales en respuesta a la alternancia diaria de luz y oscuridad [14].

4.2.4 Necesidades nutricionales de *Trichoderma viride*

Las necesidades nutricionales de *Trichoderma viride* son bien conocidas. Es capaz de degradar sustratos bastante complicados como almidón, pectina y celulosa entre otros y emplearlos para su beneficio gracias al gran complejo enzimático que tiene (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras). Del mismo modo, *Trichoderma* asimila como fuente de nitrógeno compuesto como por ejemplo aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (proceso de fermentación sólida para la producción de *Trichoderma* desde los residuos agroindustriales cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanum tuberosum*)). [15, 16].

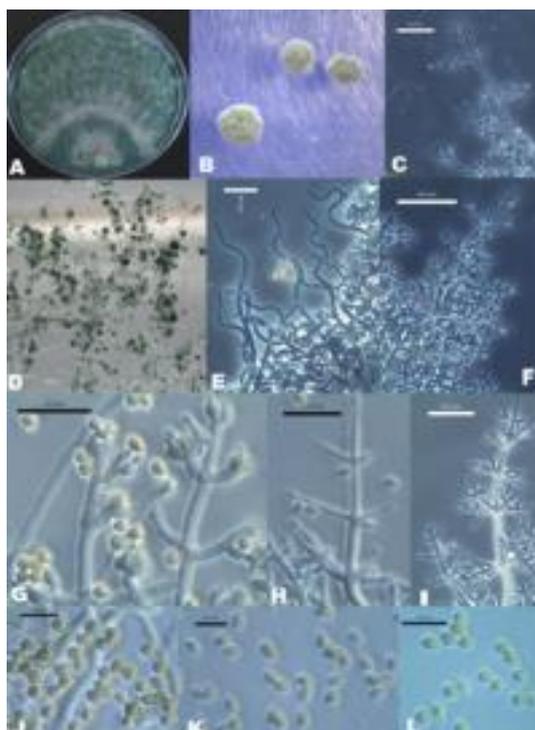


Figura 3. *Trichoderma viride* cultivado *in vitro*. a) Esporulaci3n sobre medio PDA. b-d) Pústulas. e-i) Conidióforo. j-l) Conidias.

4.3 Control biol3gico

El control biol3gico puede ser definitivo como la reducci3n del inoculo o de la actividad de un fitopatógeno mediante la acci3n natural de uno o m3s microorganismos a trav3s de la manipulaci3n del ambiente, del hospedero, del antagonista o por una introducci3n masiva de uno o m3s microorganismos [17].

Las especies del g3nero *Trichoderma* son las m3s utilizadas para el control de enfermedades de plantas causadas por hongos debido a que no afectan las plantas superiores, son f3ciles de aislar, cultivar y r3pido crecimiento en diversos sustratos [18].

Trichoderma viride controla fitopatógenos de parte a3rea mediante la colonizaci3n radicular, ya que induce la resistencia sist3mica contra ataques en otras partes de la planta. Otros estudios han demostrado que inocular las ra3ces con determinadas cepas de *Trichoderma* lleva a un aumento localizado en la planta de las enzimas vinculadas a la resistencia a pat3genos [19, 20].

El uso de *Trichoderma viride* como agente de control biológico se da por la identificación precisa, adecuada formulación y estudios acerca de los efectos sinérgicos de sus mecanismos de biocontrol, además porque presenta otras características tales como ubicuidad, facilidad para su aislamiento y cultivo, rápido crecimiento en un gran número de sustratos y porque no afecta a las plantas superiores [21].

Trichoderma viride evita y reduce las patologías causadas por hongos como: *Rhizoctonia solanii*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Sclerotium*, *Pythium*, etcétera., y patologías causadas por bacterias de los géneros como por ejemplo *Pseudomonas* y *Erwinia* [22].

Además controla ciertos tipos de nematodos patógenos de las plantas y actúa como descomponedor de materia orgánica para entregarla en forma asimilable a la planta, promoviendo su incremento y desarrollo [23].

4.4 Mecanismos de acción directos de *Trichoderma viride* como agente de biocontrol

Las diferentes especies de *Trichoderma* logran la colonización de un determinado lugar, para lo cual ejercen mecanismos por competencia directa por espacio y nutrientes, también la producción de ciertos metabolitos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos y el micoparasitismo. A continuación, se describen cada uno de ellos [24, 25].

4.4.1 Competencia por espacio y nutrientes

La inanición es la causa más común de muerte para microorganismos, la competencia por nutrientes resulta en un control biológico de hongos fitopatógenos, antagonistas y micoparásitos [26, 27]. El mecanismo de competencia que poseen algunas cepas de *Trichoderma* se considera esencial

para la prevención de enfermedades, pues la zona colonizada no podrá ser ocupada por ningún patógeno como observa en la Figura 4 [28,29].

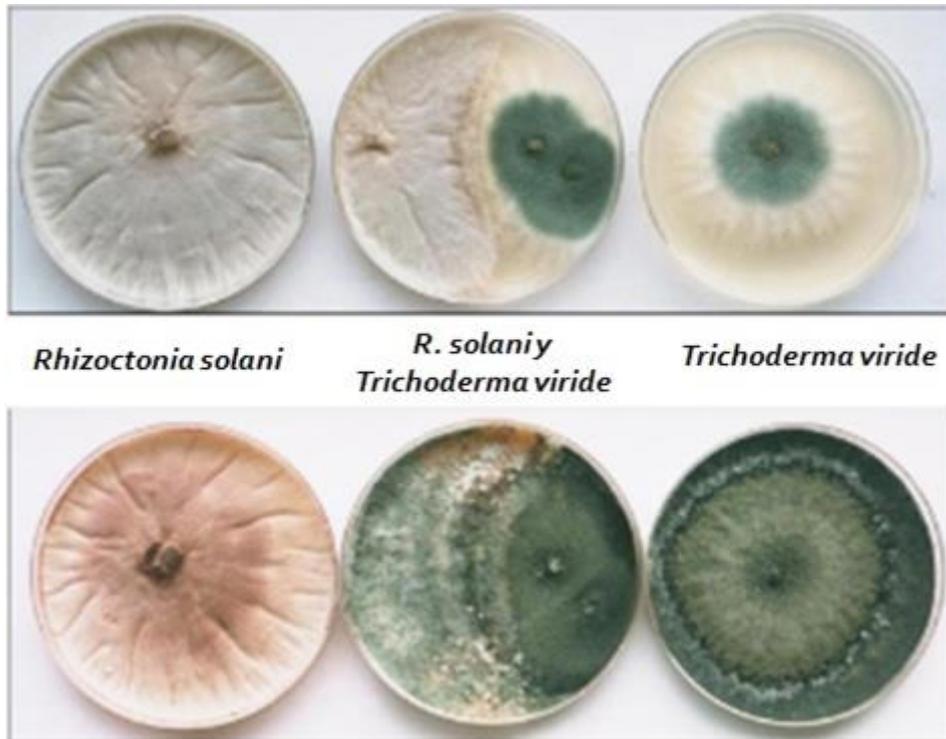


Figura 4. Inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma viride*.

4.4.2 Antibiosis

Trichoderma viride actúa sobre sus antagonistas produciendo ciertos metabolitos o antibióticos como parte de su naturaleza que inhiben el crecimiento de otros microorganismos como se muestra en la Figura 5 [30]. Estos metabolitos pueden ser viridinas, gliotoxinas y otros. Los cuales actúan directamente para inhibir el crecimiento y desarrollo de otros organismos [31, 32].

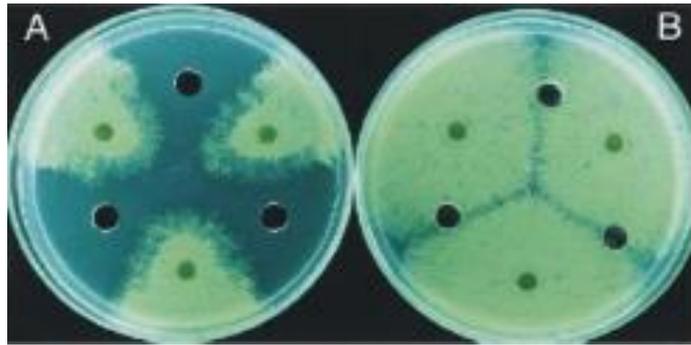


Figura 5. Inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia solani* por gliotoxina producida por *Trichoderma viride*.

4.4.3 Micoparasitismo

El ataque directo de un hongo a otro es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluye reconocimiento, ataque y penetración subsecuente y muerte al huésped [33, 34]. *Trichoderma viride* puede ejercer control directo por el rango de micoparasitismo de hongo, detectando otros hongos y creciendo sobre ellos [35]. El proceso de micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* se produce en varias etapas sucesivas como se observa en la Figura 6. Inicialmente, luego de entrar en contacto la hifa de *Trichoderma*, ésta ejerce una presión mecánica sobre la hifa del patógeno. Después, hay una generación de metabolitos al reconocimiento del patógeno y da lugar a la producción de enzimas quitinolíticas para degradar la quitina de las paredes del hongo patógeno. Seguidamente hay mecanismos de absorción del contenido citoplasmático del patógeno por *Trichoderma* [36, 37].

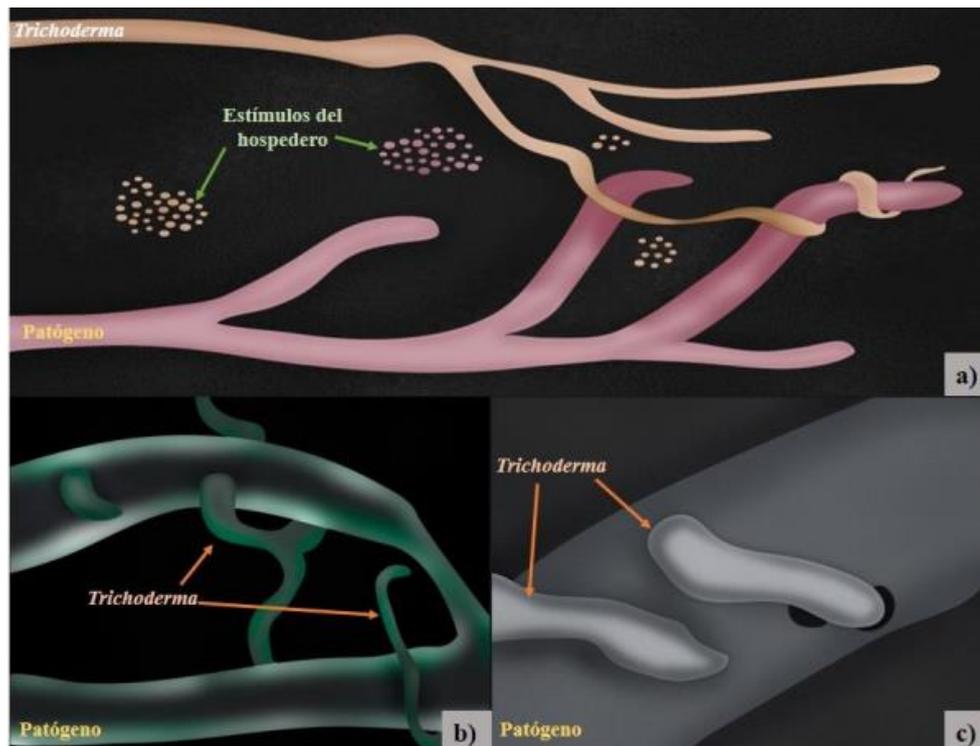


Figura 6. Micoparasitismo de *Trichoderma*: a) Crecimiento en respuesta a estímulos de la hifa del hospedero, b) Reconocimiento mediante lectinas específicas y c) Adhesión o enrollamiento y penetración al hospedero mediante la producción de enzimas quitinolíticas.

4.5 Mecanismos de acción indirectos de *Trichoderma viride* como agente de biocontrol

4.5.1 Efecto promotor del crecimiento en plantas

El género *Trichoderma* aparte de controlar enfermedades producidas por diferentes patógenos, tiene la capacidad de promover el crecimiento de las plantas inoculadas con el mismo [38, 39].

Trichoderma viride presenta acción solubilizadora de nutrientes y minerales del suelo, lo que conlleva a un aumento en el crecimiento de las plantas, además de la disminución de la actividad de organismos perjudiciales de la raíz, lo cual es

un efecto indirecto que brinda protección a las mismas contra el ataque por fitopatógenos [40].

Especies del género *Trichoderma* presentan una relación simbiótica con las raíces de plantas que determinan un aumento considerable en el crecimiento de las mismas y por lo tanto mayor tolerancia a situaciones de estrés [41, 42].

4.5.2 Solubilización de nutrientes minerales

Los nutrientes en el suelo se encuentran en diferentes formas químicas, donde muchas veces estos no se encuentran disponibles para las plantas. Ciertos microorganismos pueden transformar las formas no solubles, o sea no disponibles en disponibles para las plantas [43].

Trichoderma viride es un microorganismo con capacidad de solubilizar nutrientes y minerales del suelo no disponibles para las plantas. La forma en que lo hace es mediante tres mecanismos: acidificación del medio mediante la liberación de ácidos orgánicos que secuestran cationes y acidifican el medio alrededor de las raíces, producción de metabolitos quelantes que quelatizan Fe, Fe³⁺ y Cu²⁺ y actividad redox [44].

Debido a los mecanismos mencionados anteriormente es que, los fosfatos principalmente de calcio, Fe₂O₃, MnO₂, Cu y Zn quedarían disponibles para las plantas, lo que provoca incrementos en la altura y biomasa de las mismas [44, 45].

4.5.3 Inducción de resistencia

La resistencia se define la capacidad de un organismo para excluir o superar, por completo o en algún grado, el efecto de un agente patógeno o factor perjudicial de otro tipo [46].

La inducción de mecanismos de resistencia a enfermedades, se activa por la mediación de sistemas de reconocimiento específicos por los cuales la planta reconoce el ataque de un patógeno [47].

La planta posee la capacidad de resistir una enfermedad o adquirirla en la interacción con el patógeno, esta puede ser de dos tipos: compatible cuando ocurre enfermedad, e incompatible cuando la planta resiste [47, 48].

4.5.4 Resistencia sistémica inducida

La resistencia inducida se basa en que las plantas contienen información genética para la resistencia contra las enfermedades. Hay agentes de biocontrol como es el caso de *Trichoderma harzianum* que puede provocar que se activen mecanismos antes que se dé la infección por un patógeno [49].

Tanto la resistencia adquirida como la inducida pueden iniciarse como respuesta a una herida local, actuando en forma sistémica en la planta, brindando protección no solo el sitio donde ocurrió la inducción, sino también lugares alejados del mismo [50].

Trichoderma viride es activo contra hongos presentes en la parte aérea mediante la colonización radicular, induce la resistencia sistémica contra ataques en otras zonas de la planta [51, 52].

4.6 Sustratos que se utilizan para la producción de *Trichoderma viride*

El sustrato es la matriz donde crece el microorganismo. Es un elemento importante de la fermentación en estado sólido. El sustrato sólido no sólo sirve como soporte para la fijación de microorganismos, sino que también proporciona una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y otros nutrientes. El agua no está en forma libre sino adsorbida sobre la superficie de las partículas, y los poros intersticiales forman una red que permite el libre intercambio gaseoso, necesario para el crecimiento aeróbico [53, 54].

La producción de *Trichoderma viride* en sustratos se realiza con el fin de mantener activas las cepas del hongo para que puedan ser procesadas en residuos agrícolas [55]. Una vez esporuladas en cajas Petri en medio PDA, son

colocadas dentro de sustratos que contengan las sustancias tales como almidón, pectina y celulosa

Generalmente se utilizan compuestos procedentes de la agricultura, subproductos de la agroindustria aunque se prefiere el desecho de compuestos orgánicos debido a que suplen la demanda de nutrientes requeridos por los microorganismos a un bajo costo. Los sustratos más utilizados para la producción de esporas de *Trichoderma spp.* son los siguientes: arroz, cascarilla de arroz, olote de maíz y cascarilla de algodón [56, 57].

4.7 Evaluación de sustratos a partir de semillas y residuos orgánicos

Para la producción de microorganismos, y que estos a su vez puedan realizar de forma adecuada la síntesis celular y producir metabolitos cuando estos lo necesiten, los sustratos empleados deben tener en lo posible todos los nutrientes necesarios. El sustrato es el material donde crece el micelio y sus propiedades fisicoquímicas son las que determinan los microorganismos pueden crecer en él. En el cultivo de *Trichoderma viride* cuando se producen esporas el elemento que en mayor cantidad se encuentra es el carbono, en tanto que el porcentaje de nitrógeno se convierte en un factor que limita el crecimiento de los microorganismos. Como en muchos procesos la relación carbono nitrógeno es fundamental, en la producción de *Trichoderma* también es muy importante para la formación de esporas [58].

4.8 Estudios realizados de sustratos orgánicos para propagación de *Trichoderma*

De acuerdo a la literatura citada y consultada, el trabajo que lleva por título Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de *Trichoderma spp.* mediante fermentación en el líquido y sólido. Usaron este hongo ya que se caracteriza por su capacidad de antagonizar patógenos y evaluó en los sustratos: arroz, puntilla – granza, puntilla – granza – linaza y puntilla – broza, bajo diferentes condiciones teniendo como

consecuencia que los superiores sustratos para esparcir son puntilla – granza – linaza y puntilla – granza [59].

Por su parte otros autores hicieron un análisis sobre la determinación de la estabilidad y viabilidad de *Trichoderma harzianum* Rifai en cinco sustratos usados para la elaboración de un biofungicida. Donde se analizaron 5 sustratos para producir una cepa de *Trichoderma harzianum* y se usó cascarilla de arroz mezclado con arroz partido entre otros, comprobándose que el equilibrio del producto influye con el tipo de sustrato utilizado en la formulación y la temperatura, mostrando que el procedimiento más eficaz es el sustrato de harina de trigo [60,61].

Sin embargo otros autores trabajaron sobre los niveles de humedad y la cantidad de sustrato arroz entero para la producción de *Trichoderma spp.* y determinaron que el valor que consigue a grado local, nacional y mundial el cosechar usando agricultura orgánica conlleva a aprender diferentes metodologías amigables con el medioambiente y aptas para la salud [62, 63]. De esta forma, este análisis se hizo con diferentes volúmenes de arroz como sustrato y porcentajes de humedad a una temperatura de 20 °C con el objetivo de obtener un biopreparado, en el que se hizo pruebas de concentración de esporas ufc/g, viabilidad, virulencia y pureza teniendo excelentes resultados y dicen que los agricultores tienen la posibilidad de usar este producto desde un microorganismo productivo y cultivar sin la utilización de agroquímicos [64, 65].

Para evaluar si la cáscara de haba podía ser usada como sustrato para esparcir *Trichoderma harzianum*, tuvieron como testigo un sustrato a base de cascarilla de arroz [66,67]. Los resultados estadísticos presentaron que la cascarilla de arroz tiene una viabilidad del 96,94 % y la cáscara de haba, 92,76 %; porcentaje menor por la rigidez de este grano que no posibilita la degradación completa por el hongo en cuanto a la consistencia quebradiza del sustrato testigo, no obstante, recomiendan su uso [66, 67].

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación del sitio de estudio

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes Figura 7, en el laboratorio de Biotecnología Aplicada.



Figura 7. Ubicación geográfica de las instalaciones del ITEL, donde se realizó el trabajo de investigación.

5.2 Actividades preliminares

5.2.1 Obtención de las cepas

Como material biológico se utilizó una cepa del hongo *Trichoderma viride* la cual fue donada por el IPYCIT (Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica) al Instituto Tecnológico El Llano.

5.2.2 Conservación de las cepas

La conservación en aceite mineral se realizó una vez que las cepas fueron cultivadas y mantenidas en medio papa dextrosa agar (PDA) y esporularan pasadas las 72 h de incubación fueron cubiertas completamente con aceite mineral.

5.2.3 Cultivo *in vitro* de *Trichoderma viride*

5.2.3.1 Preparación del medio de cultivo (PDA)

El medio de cultivo con mejor efecto para el desarrollo y la multiplicación del hongo *Trichoderma* es PDA (papa, dextrosa y agar).

De acuerdo a las indicaciones del fabricante, se rehidrataron 39 g del medio en un litro de agua destilada, dejando reposar de 10 a 15 minutos. Posteriormente, se puso a calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para que se disuelva por completo. Después se llevó a esterilizar en autoclave durante 15 minutos. Por último, se vació en cajas de Petri estériles.

5.1.3.2 Procedimiento de resiembra en el medio de cultivo PDA

Se tomó una caja con medio y otra con la cepa a utilizar. Para resembrar se tomó una pequeña parte de una caja Petri esporulada con el hongo *Trichoderma viride* con un palillo estéril y se colocó en el nuevo medio donde se propagará. Por último, se rotuló y selló con plástico Parafilm® para evitar que se contamine con microorganismos del ambiente.

5.2.4 Preparación de los sustratos

Se lavaron los sustratos con agua corriente: (semillas de arroz, frijol y gandul con su respectivo rastrojo), se pesaron 500 g y se dejaron remojando en sacarosa al 2 %, en el caso de las semillas de arroz después de lavarse se pusieron a pre-cocer durante 1 hora a fuego medio a una temperatura de 70 °C. Después se colaron y se pusieron a escurrir durante 30 minutos para embolsarse y por último se dispusieron en la autoclave para esterilizar Figura 8. Terminado este proceso se llevaron las matrices a la cámara de flujo laminar en donde se realizó la siembra de *Trichoderma viride* como se puede ver en las

Para el segundo experimento se realizó el procedimiento anterior con los sustratos: maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo. En este experimento se

quebraron las semillas para exponer el almidón de la parte interna del endospermo, las semillas se trituraron con ayuda de un molino como se observa en la Figura 9.



Figura 8. Sustratos orgánicos: arroz, frijol y gandul y rastrojos



Figura 9. Sustratos orgánicos: maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo.

5.2.4.1 Siembra de *Trichoderma viride* en sustratos agrícolas

Se preparó 1 L de suspensión madre la cual se utilizó para inocular las matrices, procediendo de la siguiente forma: se desinfectó la campana de flujo laminar con alcohol y se encendió el mechero en donde se flameó el matraz y la

espátula. Posteriormente se tomaron 30 cajas de Petri cultivadas con *Trichoderma viride* que contenían cuerpos fructíferos con esporas maduras (con un color verde intenso) y a cada cajita se añadieron 2 mL de agua destilada estéril. Posteriormente, con una espátula se rasparon cuidadosamente todas las esporas y se vació el contenido en un matraz con 1 L de agua estéril, el cual se agitó para que las esporas se disolvieran muy bien como se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Preparación de la suspensión de *Trichoderma viride*.

Cada sustrato se prepara seis veces, poniendo en cada matriz 50 mL de la suspensión madre, se mezcló suavemente para que las esporas se dispersaran por el sustrato tal como se muestra en la Figura 11 y 12.

C



Figura 11. Siembra de *Trichoderma viride* en sustratos: arroz frijol y gandul y rastrojos.



Figura 12. Siembra de *Trichoderma viride* en sustratos: maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo.

Posteriormente se rotularon y se llevaron a incubar durante tres días en un cuarto oscuro y al cuarto día se expusieron a la luz blanca y ahí se dejaron hasta que esporularan completamente a una temperatura de 25 ± 1 °C para su crecimiento, durante 15 días como se muestra en la Figura 13 y 14.



Figura 13. Inoculación e incubación de *Trichoderma viride*: arroz frijol y gandul y rastrojos.



Figura 14. Inoculación e incubación de *Trichoderma viride*: maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo.

5.3 Experimentos para la evaluación de los sustratos

5.3.1 Experimento para evaluar los sustratos de arroz, frijol y gandul y rastrojos

Se hicieron dos experimentos en los cuales se aplicó un diseño completamente al azar con seis repeticiones. En el primer experimento se usaron los sustratos: arroz, frijol, gandul y sus respectivos rastrojos. Utilizándolos tal cual o haciendo mezclas básicas por pares (al 50 %) los experimentos se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos del primer experimento para determinar la producción de esporas de *Trichoderma viride* en condiciones de laboratorio.

Tratamiento	Descripción
T1	Arroz
T2	QSA
T3	Frijol
T4	Tazole
T5	FQ+Tz
T6	Gandul
T7	RG
T8	GQ+RG

5.3.2 Experimento para evaluar los sustratos de maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo

En el segundo experimento se utilizaron como sustratos: maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo de nueva cuenta se aplicó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y seis repeticiones en el Cuadro 2 se mencionan los tratamientos.

Cuadro 2. Tratamientos del segundo experimento para determinar la producción de esporas de *Trichoderma viride* en condiciones de laboratorio.

Tratamiento	Descripción
T1	Maíz
T2	Avena
T3	Sorgo
T4	Trigo
T5	Garbanzo

5.3.3 Experimentos para evaluar los mejores sustratos

Se realizaron diluciones decimales, colocando 1 g de sustrato de las matrices en 10 mL de agua estéril, luego se agitaron utilizando un vórtex hasta que las esporas se desprendieran. Se tomó 1 mL de la suspensión y se vació en tubo Falcon® de 15 mL con 9 mL de agua estéril y se agitó con vórtex para obtener la primera dilución o 10^{-1} . De ésta se tomó nuevamente 1 mL y se procedió de manera subsecuente con el siguiente tubo hasta completar la operación previamente descrita. Este procedimiento fue repetido hasta obtener una dilución 10^{-9} tal y como se muestra en la Figura 15.

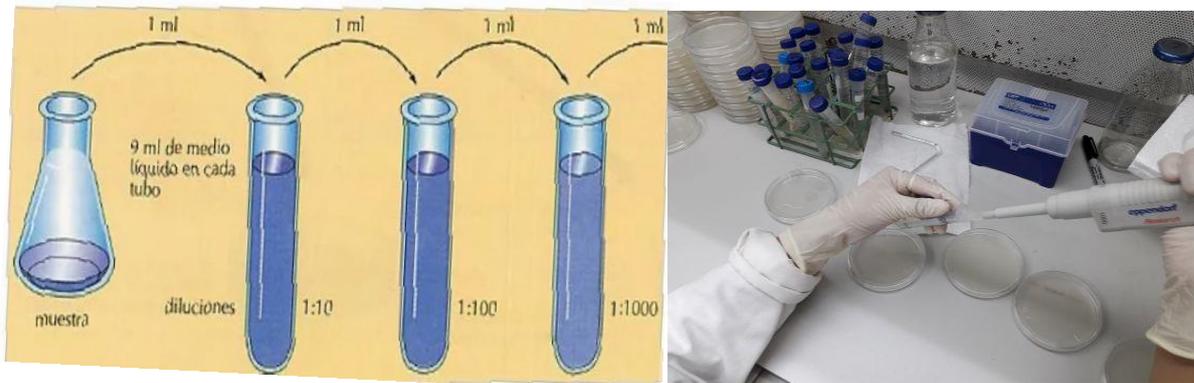


Figura 15. Dilución de esporas de *Trichoderma viride*.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Resultados de los estudios preliminares

Conservación de cepas madre de *Trichoderma viride*

El aceite mineral se ha utilizado para la conservación de diferentes hongos entomopatógenos como se muestra en la Figura 16. La viabilidad de la cepa de *Trichoderma viride* conservada en aceite mineral es del 50 % a los 12 meses estos resultados coinciden con los obtenidos por Bueno y Gallardo [68] quienes conservaron en aceite mineral otras especies de *Trichoderma* por un período de dos años.



Figura 16. Conservación de cepa de *Trichoderma viride* en medio de cultivo PDA.

De acuerdo a la metodología aplicada para el cultivo *in vitro* de *Trichoderma viride* se obtuvo la esporulación total del hongo en toda la caja de Petri como se muestra en la Figura 17 además de que se controló la asepsia y los cultivos no se contaminaron.



Figura 17. Resiembra y esporulación en PDA de *Trichoderma viride*.

6.2 Resultados del experimento para evaluar los sustratos de arroz, frijol y gandul y rastrojos

Todos los días se revisó el crecimiento de *Trichoderma viride*. Al sexto día se observó:

A los seis días de crecimiento del hongo *Trichoderma viride*, se observa el crecimiento de este hongo en sustrato en la Figura 18.



Figura 18. Seis días de crecimiento de *Trichoderma viride* en arroz y cascara de frijol.

A los nueve días de crecimiento del hongo *Trichoderma viride*, se observa que los sustratos están invadidos por el hongo en estudio en la Figura 19.



Figura 19. Nueve días de crecimiento de *Trichoderma viride* en arroz y cascara de frijol.

A los doce días de crecimiento del hongo *Trichoderma viride*, se observa que los sustratos están invadidos tres cuartas partes por el hongo en estudio en la Figura 20.



Figura 20. Doce días de crecimiento de *Trichoderma viride* en arroz y cascara de frijol.

A los quince días de crecimiento del hongo *Trichoderma viride*, se observa que los sustratos están invadidos en su totalidad por el hongo en estudio en la Figura 21.



Figura 21. Quince días de crecimiento de *Trichoderma viride* en arroz y cascara de frijol.

De los resultados obtenidos en esta investigación se acepta la hipótesis planteada que establece que si el hongo el *Trichoderma viride* se realiza en un sustrato orgánico, entonces se podría usar para su reproducción.

Los sustratos agrícolas que contienen almidón tuvieron gran cantidad de esporas pues es utilizado como principal fuente de alimentación para *Trichoderma viride*. En un primer experimento, se determinó mediante comparación estadística de medias de crecimiento de micelio como mejores al tazole (cascara de frijol), semillas de arroz entero y arroz quebrado como se muestra en la Figura 22. Sin embargo, sólo el tazole llegó a un máximo que apenas supera el 80 por ciento.

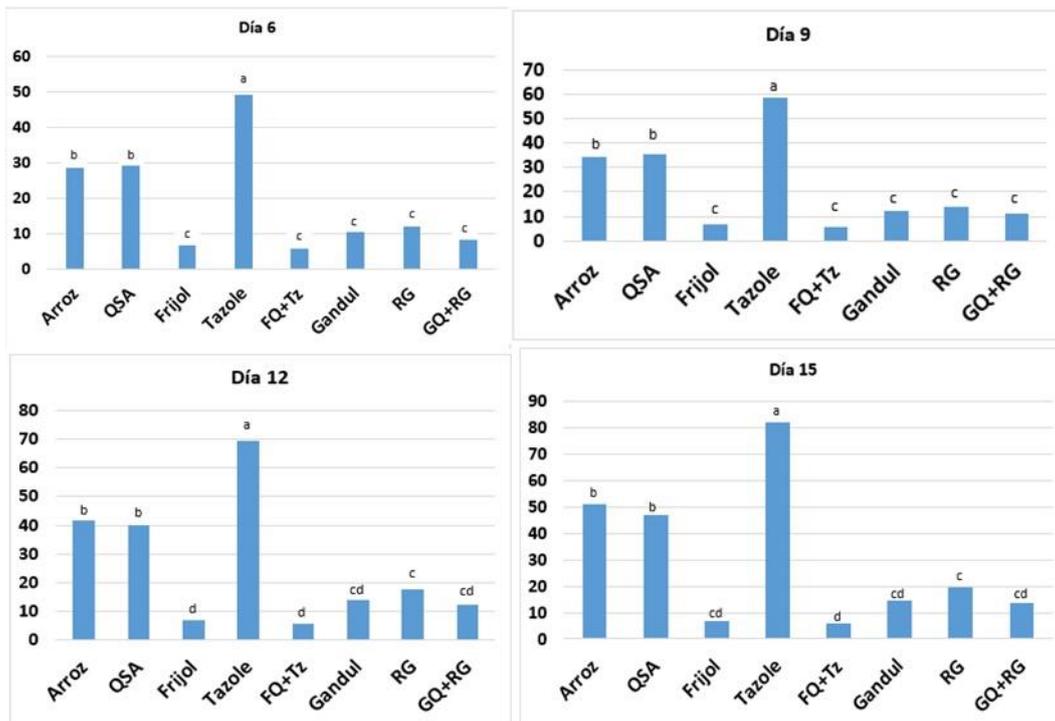


Figura 22. Evolución del crecimiento de micelio de *Trichoderma viride* en ocho matrices preparadas con semillas y rastrojos ($p < 0.05$).

Este proceso de siembra de *Trichoderma viride* para propagación en los sustratos orgánicos en estudio, se realizó incubando a temperaturas de 25 °C a 30 °C para determinar en qué sustrato se propagó de manera óptima.

Se realizaron nueve repeticiones por cada tratamiento para el conteo de esporas de cada sustrato desde el quinceavo día de 24 a 48 horas de incubación se determinó que el mejor sustrato es el tazole (cascara de frijol) con 4.5×10^8 ufc/mL, seguido por las semillas de arroz QSA (quebrado de semillas de arroz) con 3.7×10^8 ufc/mL con 3.11×10^8 ufc/mL.

En la Figura 23 se observa el crecimiento, teniendo la mayor cantidad de esporas el tazole (cascara de frijol).

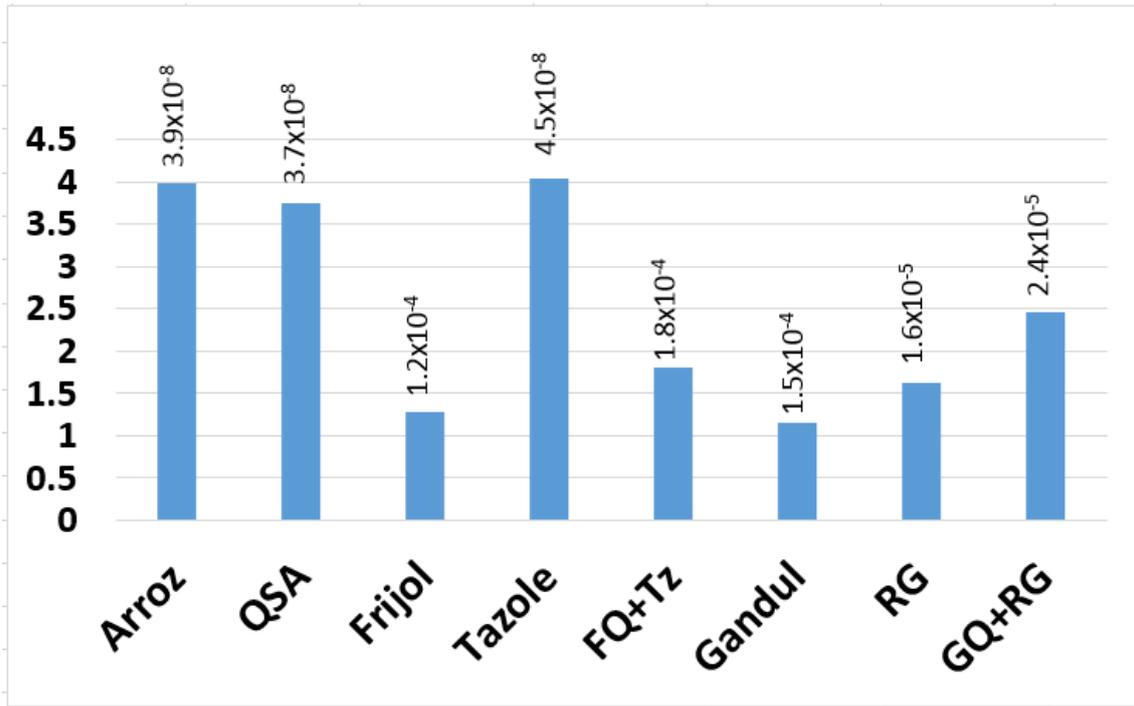


Figura 23. Concentración de esporas.

6.3 Resultados del experimento para evaluar los sustratos de maíz, avena, sorgo, trigo y garbanzo

En la Figura 24, se muestra la esporulación de *Trichoderma viride* en el segundo experimento que se realizó, los tratamientos elaborados con maíz quebrado, garbanzo, sorgo y trigo tuvieron un 100 % de crecimiento del micelio de *Trichoderma viride*. Solamente el caso de la avena no resultó ser un sustrato atractivo para este hongo. No obstante, se pudo apreciar que, en la evolución del crecimiento el primero en alcanzar el 100% de la cobertura fue el sustrato elaborado con maíz quebrado. Durante la observación que se realizó cada tercer día, en la combinación de las mezclas de maíz quebrado se observó que el crecimiento de *Trichoderma viride* es más rápido que el resto, esporulando en su mayoría a los 10 días. Esto debido a la gran cantidad de almidón que contiene el sustrato como se muestra en la Figura 13.



Figura 24. Esporulaci3n de *Trichoderma viride* en sustratos de: a) ma3z, b) sorgo, c) trigo.

En la Figura 25 se observa el crecimiento acelerado de *Trichoderma viride* en sustratos con mayor cantidad de almid3n, teniendo la mayor cantidad de esporas el ma3z, sorgo, garbanzo y trigo al sexto, noveno, doceavo y quinceavo d3a.

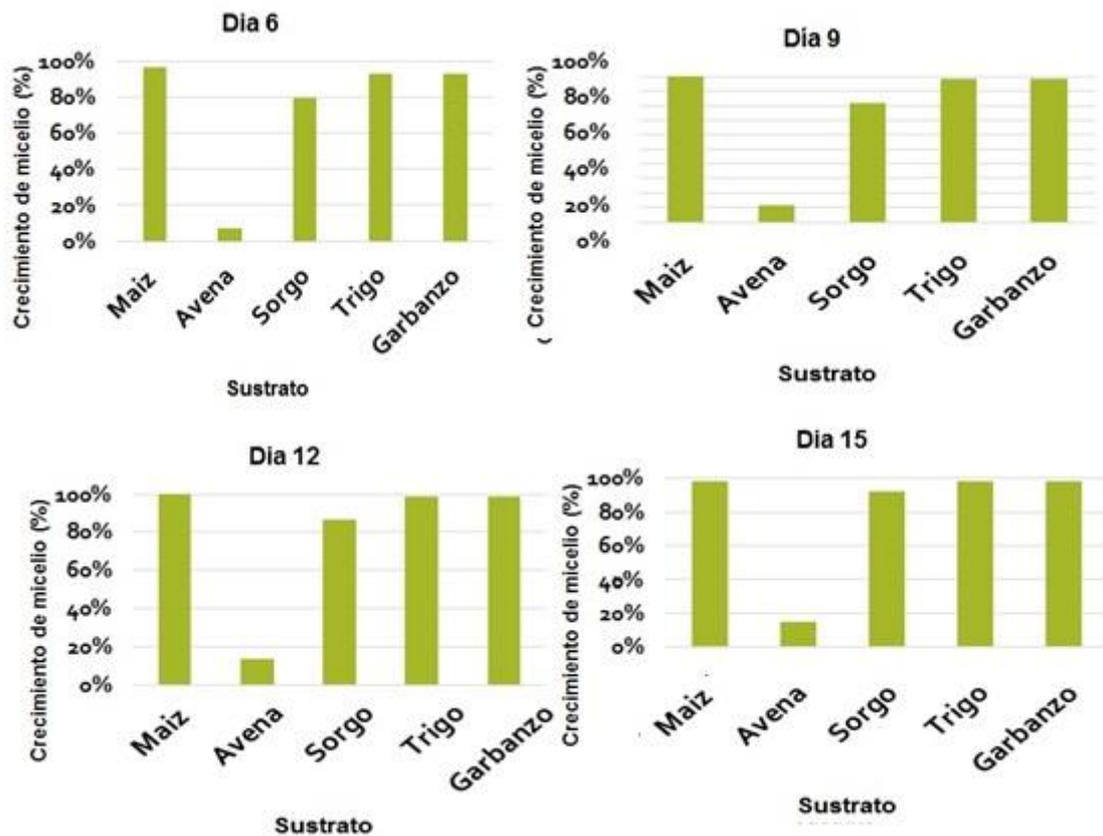


Figura 25. Evolución del crecimiento de micelio de *Trichoderma viride* en cinco matrices preparadas con semillas.

De igual forma se realizaron nueve repeticiones por cada tratamiento para el conteo de esporas de cada sustrato desde el quinceavo día y de 24 a 48 horas de incubación se determinó que el mejor sustrato es el maíz con 6.6×10^8 ufc/mL, seguido por el sorgo con $6.3.7 \times 10^8$ ufc/mL, garbanzo con 6.2×10^8 ufc/mL y trigo con 5.9×10^8 ufc/mL como se muestra en la Figura 26.

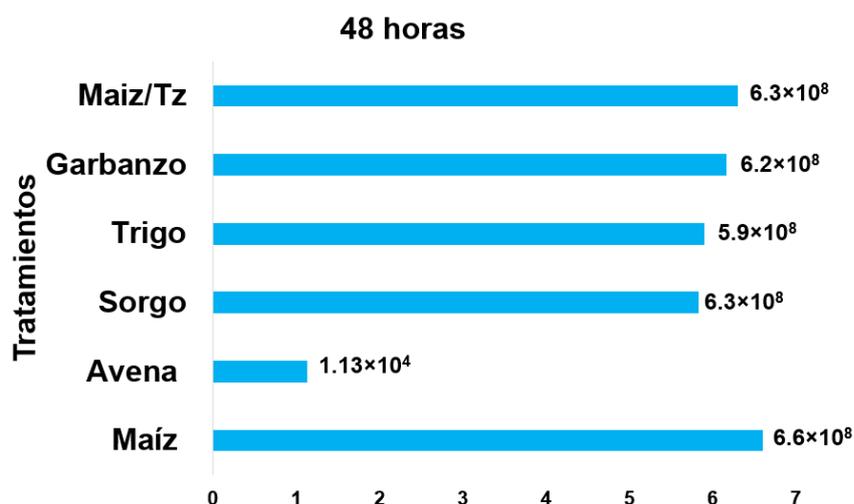


Figura 26. Concentración de esporas / g

6.4 Resultados de la evaluación de los mejores sustratos para la producción de *Trichoderma viride*

Los análisis estadísticos para determinar los mejores sustratos fueron realizados en la paquetería de office “Excel”, mediante un ANOVA y estadísticamente se demostró que hay diferencia significativa entre los tratamientos. El que presentó mayor crecimiento de *Trichoderma viride* del primer experimento se encuentra el tazole (cascara de frijol), seguido de las semillas de arroz enteras y quebradas como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Comparación de promedios en los tratamientos

Día 6							
Arroz	QSA	Frijol	Tazole	FQ + Tz	Gandul	RG	GQ + RG
16.15	7.47	9.13	38.62	8.02	9.15	16.02	7.13
9.17	48.75	5.42	42.56	4.31	11.31	14.31	5.47
35.74	17.3	7.05	55.32	6.03	13.55	10.03	7.33
44	33.6	6.11	57.21	5	8.13	13.07	13.45
49.61	41.79	7.18	49.65	6.07	10.14	8.05	6.07
16.67	25.58	5.34	51.89	4.23	9.79	10.33	9.17

28.55667 29.08167 6.705 49.20833 5.61 10.345 11.96833 8.103333

Día 9							
Arroz	QSA	Frijol	Tazole	FQ + Tz	Gandul	RG	GQ + RG
18.57	12.4	9.35	44.21	8.24	9.28	17.24	7.35
15.46	55.98	5.42	55.36	4.31	12.98	21.31	8.31
41.21	24.23	7.52	59.89	6.41	17.93	12.41	9.58
50.6	36.2	6.11	65.86	5	8.13	13.25	17.84
57.82	55.32	7.23	58.87	6.12	11.54	8.34	9.83
21.86	30.13	5.34	66.43	4.23	13.44	10.58	15.46

34.2533333 35.71 6.8283333 58.436667 5.7183333 12.216667 13.855 11.395

Día 12							
Arroz	QSA	Frijol	Tazole	FQ + Tz	Gandul	RG	GQ + RG
23.86	14.18	9.35	57.41	8.24	9.36	27.24	8.35
21.59	63.53	5.42	77.58	4.31	15.76	27.31	8.39
54.48	26.43	7.57	68.84	6.46	19.82	16.46	9.78
58.6	46.43	6.11	78.37	5	8.13	13.68	20.59
65.61	57.41	7.35	66.71	6.24	13.51	8.42	11.81
25.27	32.28	5.34	68.52	4.23	16.35	13.64	15.76

41.568 40.0433333 6.85666667 69.5716667 5.74666667 13.8216667 17.7916667 12.4466667

Día 15							
Arroz	QSA	Frijol	Tazole	FQ + Tz	Gandul	RG	GQ + RG
31.03	16.12	9.35	69.46	8.24	9.88	36.24	8.68
29.89	79.7	5.42	88.75	4.31	15.86	29.31	8.47
66.98	32.03	7.57	79.42	6.46	19.82	16.46	10.53
68.92	49.02	6.11	89.74	5	8.13	13.73	25.54
83.58	68.38	7.83	84.68	6.72	15.22	8.72	14.06
27.28	37.16	5.34	79.49	4.23	18.27	13.84	15.86

51.28 47.0683333 6.93666667 81.9233333 5.82666667 14.53 19.7166667 13.8566667

Cada tercer día se midió el porcentaje de crecimiento utilizando plantillas de cartulina. Se dibujó una plantilla de cartulina en toda la superficie de las bolsas plásticas indicando que es el total el 100%. En el transcurso de los días (6, 9, 12 y 15) se dibujaron plantillas de acuerdo al crecimiento y se comparó contra la plantilla del 100% en base al peso para así obtener el porcentaje de crecimiento.

Usar semillas de maíz, garbanzo, sorgo y trigo quebradas adicionándoles sacarosa al 2 % ayuda a estimular la presencia de almidón considerablemente durante el desarrollo y la esporulación. De los dos experimentos presentados, el sustrato más adecuado para la matriz sólida para una buena y rápida producción de esporas de *Trichoderma viride* fue la elaborada con maíz quebrado con un resultado de un 100 % de crecimiento de *Trichoderma*. Eventualmente, se puede sustituir con tazole (rastroj de frijol), dando por resultado un 80 % de crecimiento de micelio, que se puede considerar una opción muy buena para la utilización de rastrojos y con inversión de muy bajo costo si se requiere hacer escalamiento bajo las condiciones de que disponen los agricultores.

De acuerdo con la bibliografía consultada se establece que hay estudios en donde se aísla el hongo *Trichoderma viride* para usarlo como controlador biológico y evadir la utilización indiscriminado de agroquímicos, utilizando cepas de microorganismos a partir de una muestra de suelo inoculada en agar PDA

Con el propósito de sustituir el grano de arroz, se han llegado a usar como sustratos los residuos agrícolas de cascarilla de arroz completa y molida, cáscara de cacahuate como fuentes nutritivas demostrando que se tiene un rendimiento mayor a 1.10×10^8 conidios/mL de sustrato en los residuos agrícolas que fueron mezclados con arroz [68].

Otros autores usaron semillas de *Artocarpus incisa* (fruta de pan) y desperdicios agroindustriales como cascarilla de arroz y algodón teniendo la mejor producción de esporas en el sustrato formado por cascarilla de algodón (enriquecida con resoluciones de melaza) y semillas de *Artocarpus incisa* con una concentración de 2.1×10^8 conidios/mL, y 8.38×10^8 conidios/mL [69].

Para decidir cuál es el mejor sustrato orgánico para producir *Trichoderma viride*, se evaluaron el número de conidias/mL tal y se siguió el mismo procedimiento donde coincidieron los diversos estudios realizados con el presente trabajo de investigación [70].

De acuerdo con las investigaciones consultadas, se establece que la temperatura influye en la propagación de *Trichoderma spp.*, quienes compararon las curvas de incremento con el hongo *Trichoderma harzianum* en los diferentes sustratos orgánicos, la temperatura óptima para el desarrollo es de 30 °C, y en esta investigación se concluye que de 25 a 30 °C es mayor la producción de esporas en los sustratos que se probaron.

VII. CONCLUSIONES

A partir de las evaluaciones realizadas se encontraron como mejores sustratos para la producción de esporas de *Trichoderma viride* del primer experimento, tazole (cascara de frijol) y arroz. Del segundo experimento fueron el maíz, trigo y garbanzo, el que mejor destacó fue el maíz alcanzando el máximo crecimiento de este hongo en tan pocos días.

Las cantidades óptimas para el crecimiento de *Trichoderma viride* en matriz solida fueron las siguientes: sustrato 500 g, previamente remojado en 2 % de sacarosa y 50 mL de la suspensión madre de *Trichoderma viride*.

El tazole es una opción de bajo costo con un 80% de crecimiento cuando no se tiene suficiente capital para gastarlo en semilla como sustrato. Este material es ideal para la producción a gran escala de *Trichoderma viride* con el cual se puede obtener una aceptable concentración de esporas y mediante los resultados obtenidos se puede mezclar con maíz ya que se demostró que es un excelente sustrato para producirlo.

Se determinó que los sustratos con mayor cantidad de almidón son ideales para la propagación *Trichoderma viride* por lo que se puede reemplazar el uso del arroz como sustrato.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Aceves, A., M. Otero, R. Martínez, N. Rodríguez, R. Ariza y A. Barrios (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. Chilpancingo, Guerrero. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14: 185-191
2. Acosta Toro, Ó. A. (2015). Comportamiento de *Trichoderma sp.*, bajo diferentes condiciones de laboratorio. Universidad Técnica de Ambato. Tesis para obtención de grado de ingeniero agrónomo
3. Agamez Ramos, E. Y., R. I. Zapata Navarro, L. E. Oviedo Zumaque y J. L. Barrera Violeth (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp.* *Colomb. Biotecnol*, 5: 23-24.
4. Aguilar Raymundo, V. G. y J. F. Vélez Ruiz (2013). Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7: 25-34.
5. Aguirre Tafur, D. H. y Y. K. Calderón Mera (2015). Elaboración de una mezcla alimenticia extruida a base de harina de quinua (*Chino pódium quinoa Willd*), arroz (*Oriza sativa*) y frijol gandul (*Canajus cajan*) saborizado con harina de lúcumá. Tesis para obtención de título de ingeniero en industrias alimentarias.
6. Albarran, S., D. Chauhan, B. Pandya y A. Padhiar (2011). Cribado de *Trichoderma spp.* como posible socio fúngico en el cocultivo con hongos de podredumbre blanca para una bio-pulpa eficiente. *Glob J Biotechnol Biochem*, 6: 95-101.

7. Ali, H. Z., H. M. Aboud, N. S. Dheyab, N. K. Musa and F. H. Gasam (2015). Effects of pH and ECW on Growth and Sporulation of Indigenous *Trichoderma* spp. *International Journal of Phytopathology*, 4: 15-20.
8. Allori Stazonelli, E., M. G. Yasem de Romero y L. D. Ploper (2017). Evaluación de sustratos para la producción de esporas de *Trichoderma* y estudio del crecimiento en arroz de las cepas antagonistas TPT03, TPT02, MRT35 y MRT40. *Revista agronómica del noroeste argentino*, 37: 57-66.
9. Amaro Leal, L., O. Romero Arenas, T. A. Rivera y L. M. Huerta (2015). Producción de *Trichoderma viride* en diferentes sustratos agrícolas. V Congreso Latinoamericano de Agroecología-SOCLA (7 al 9 de octubre de 2015, La Plata) pp. 5.
10. Arevalo, E., J. Cayotopa, D. Olivera, M. Gárate, E. Trigos, B. Costa y B. León (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. *Investigacion Altoandina*, 19: 135 – 144.
11. Ávalos, G. y V. Geoconda (2016). Determinación de la estabilidad y viabilidad de *Trichoderma harzianum* Rifai en cinco sustratos usados para la elaboración de un biofungicida en formulación líquida (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo). Riobamba, Ecuador.
12. Bautista, E. J., L. Mesa y M. I. Gómez Álvarez (2018). Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. *Scientia Agropecuaria*, 9: 585-604.
13. Benítez, T., A. M. Rincón, M. C. Limón y A. C. Codon (2010). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7: 249-260.

14. Benhamou N. y I. Chet (1996). Parasitism of *Sclerotia* of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: Ultrastructural and Cytochemical Aspects of the Interaction, *Phytopathology*, 86: 405-416.
15. Bueno, L. y R. Gallardo (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril, *Rev. Iberoam. Micol.* 15: 166-168.
16. Bóffano Chebataroff, A. y M. A. Mosqueira Campos, (2012). Evaluación de la respuesta de cinco diferentes híbridos de *Eucalyptus grandis*, con *Trichoderma harziannum* y quitosano en vivero y plantación. Universidad de la República, Uruguay. Tesis presentada como uno de los requisitos para obtener el título de ingeniero agrónomo.
17. Bravo Oropeza, J. C. y F. Ledezma Aguilera (2015). Efecto de *Trichoderma* en tratamiento de semilla sobre componentes de rendimiento y calidad de grano en el cultivo de soya en la variedad tornado (campaña invierno 2014). Universidad, Ciencia y Sociedad, pp. 48-59.
18. Brotman, Y., J. G Kapuganti y A. Viterbo (2010). *Trichoderma*. *Biología actual*, 20: R390-R391.
19. Brunner, K., S. Zeilinger, R. Ciliento, S. L. Woo, M. Lorito, C. P. Kubicek y R. L. Mach (2005). Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and environmental microbiology*, 71: 3959-3965.
20. Cavalcante, R. S., H. L. Lima, G. A. Pinto, C. A. Gava y S. Rodriguez (2008). Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food and Bioprocess Technology*, 1: 100-104.

21. Chávez, C. M. F. (2018). Producción de *Trichoderma* spp, en diferentes sustratos. *Revista Estudiantil AGRO-VET*, 2: 220-224.
22. Chávez García, M., J. S. Montaña Lara, M. M. Martínez Salgado, M. Mercado Reyes, M. X. Rodríguez y B. Quevedo Hidalgo (2008). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. *Universitas Scientiarum*, 13: 245-251.
23. Companioni González, B., G. Domínguez Arizmendi y R. García Velazco (2019). *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal*, 19: 237-248.
24. García Nuñez, H. G. y A. R. Martínez Campos (2016). Evaluación de los mecanismos de acción biológica de *Trichoderma*. Universidad Autónoma del Estado de México. Tesis de Doctorado
25. García, S., J. Moya, E. Avilés, F. Andújar y P. Núñez (2015). Efectividad de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento micelial de fitopatógenos de suelo en plato Petri. *Revista APF*, 4: 43-66.
26. Gato Cárdenas, Y. (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad*, 14: 189-195.
27. Guédez, C., L. Cañizalez, C. Castillo y R. Olivar (2012). Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología*, 32: 44-49.
28. Guilcapí A. (2016). Determinación de la estabilidad y viabilidad de *Trichoderma harzianum* Rifai en cinco sustratos usados para la

elaboración de un biofungicida en formulación líquida. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Tesis de Licenciatura

29. Hermosa, R., A. Viterbo, I. Chet y E. Monte (2012). Efectos beneficiosos para las plantas de *Trichoderma* y de sus genes. *Microbiología*, 158: 17-25.
30. Hernández, M. I., A. R. Hernández y L. C. González (2016). Niveles de humedad, cepa y cantidad de sustrato arroz entero para la reproducción de *Trichoderma* spp. *Revista Científica Agroecosistemas*, 4: 38-45.
31. Hewavitharana, N., S. D. P. Kannangara and S. P. Senanayake (2018). Isolation, Identification and Mass production of five *Trichoderma* spp. on Solid and Liquid Carrier Media for Commercialization. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 6: 285-293.
32. Hubbard, J. E., H. H. Hall y F. R. Earle (1950). Composición de los componentes del núcleo de sorgo. *Cereal Chemistry*, 27: 415-420.
33. Infante, D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24:14-21.
34. Irimia Hernández, M., A. Rodríguez Hernández y L. Castellanos González (2016). Niveles de humedad, cepa y cantidad de sustrato arroz entero para la reproducción de *Trichoderma* spp. *Agrosistema*, pp.40-47.
35. Jin, X. and D. Custis (2011). Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control*, 56: 202-208.

36. Kashyap, P. L., P. Rai, A. K. Srivastava y S. Kumar (2017). *Trichoderma* para agricultura resistente al clima. *Revista Mundial de Microbiología y Biotecnología*, 33: 155.
37. Kapri, A. y L. Tewari (2010). Potencial de solubilización de fosfato y actividad fosfatasa de *Trichoderma* spp. *Revista Brasileña de Microbiología*, 41: 787-795.
38. Kredics L., Z. Antal, L. Manczinger, A. Szekeres, F. Kevei y E. Nagy (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*. pp. 37- 42.
39. Lorenzo M. (2004). Prospección de hongos antagonistas en la provincia de cienfuegos. Efectividad y posibilidades de reproducción de cepas nativas de *Trichoderma* spp. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, Cuba. pp.64.
40. Martínez, B., D. Infante y Y. Reyes (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28: 1-11.
41. Mata, J. A., M. C. S. Cuevas y R. S. Acuña (2018). Evaluación de sustratos sobre la tasa de crecimiento radial de cultivos duales de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomía Tropical*, 68: 87-94.
42. Michel Aceves, A. C., M. A. Otero Sánchez, R. D. Martínez Rojero y N. L. Rodríguez Moran (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Chapingo Serie Horticultura*, 21: 185-191.

43. Muñoz, G. A., E. Agosin, M. Cotoras, R. S. Martin y D. Volpe (1995). Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. *FEMS microbiology letters*, 125: 63-69.
44. Moya, J., S. García, E. Avilés, F. Andújar y P. Núñez (2014). Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas de invernadero en la República Dominicana. *Revista APF*, 3:11-16.
45. Nampoothiri K., T. Baiju, C. Sandhya, A. Sabu, G. Szakacs y A. Pandey (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*. pp. 1583-1590.
46. Obregón, Y. A., E. T. Rosales y S. M. M. Diego (2017). Producción de *Trichoderma harzianum* A-34 en sustratos sólidos alternativos. *Fitosanidad*, 21: 115-120.
47. Onilude, A. A. and D. O. Seyi Amole (2018). Mycelia growth and spore yield of *Trichoderma harzianum* in batch and fed batch cultures: Influence of pH and temperature. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 7: 627-635.
48. Padrón Zamora, D. (2014). Metodología para la producción de *Trichoderma viride* Pers. sobre sustrato inerte no esterilizado. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Tesis doctoral
49. Panahian, G. R., K. Rahnama and M. Jafari (2012). Mass production of *Trichoderma* spp. and application. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 3: 292-298.
50. Parkash, V. and A. J. Saikia (2015). Production and multiplication of native compost fungal activator by using different substrates and its influence on growth and development of *Capsicum chinensis*. *Biotechnology research international*, vol. 2015.

51. Pérez Guerra, N., A. Torrado Agrasar, C. López Macías and L. Pastrana (2003). Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2: 343-350.
52. Pinta García, A. F. (2020). Evaluación de residuos vegetales para la multiplicación de *Trichoderma* spp. Universidad Central del Ecuador. Tesis de licenciatura.
53. Postemsky, P. D. y R. I. López Castro (2016). Aplicaciones de sustrato residual del cultivo de hongos en la producción hortícola. *Horticultura Argentina*, 35; 86; 4-2016; 44-63
54. Ruíz Herrera, J. (2013). *Viaje al asombroso mundo de los hongos*. Fondo de Cultura Económica: México, pp.190.
55. Rodríguez León, J. A., F. Domenech, M. León, T. Méndez, D. E. Rodríguez and A. Pandey (1999). Production of spores of *Trichoderma harzianum* on sugar cane molasses and bagasse pith in solid state fermentation for biocontrol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(1), 0-0.
56. Sacks, T. C. y M. Molar (2021). Asociaciones de bacterias y hongos benéficos como estrategia de control de *Nacobbus aberrans* en el Cinturón Hortícola de La Plata. Universidad Nacional de La Plata. Tesis doctoral.
57. Santana, L. I. (2013). Efecto de la humedad en la concentración y viabilidad de conidios de *Trichoderma Harzianum* en diferentes sustratos. Universidad de Matanzas. Tesis Doctoral.

58. Sargin, S., Y. Gezgin, R. Eltem and F. Vardar (2013). Micropropagule production from *Trichoderma harzianum* EGE-K38 using solid-state fermentation and a comparative study for drying methods. *Turkish Journal of Biology*, 37: 139-146.
59. Schuster, A. y M. Schmoll (2010). Biología y biotecnología de *Trichoderma*. *Microbiología y biotecnología aplicadas*, 87: 787-799.
60. Silva Cristobal, L., P. Osorio Díaz, J. Tovar and L. A. Bello Pérez (2010). Chemical composition, carbohydrate digestibility, and antioxidant capacity of cooked black bean, chickpea, and lentil Mexican varieties Composición química, digestibilidad de carbohidratos, y capacidad antioxidante de variedades mexicanas cocidas de frijol negro, garbanzo, y lenteja. *Cyta Journal of Food*, 8: 7-14.
61. Singh, P. C. and C. S. Nautiyal (2012). A novel method to prepare concentrated conidial biomass formulation of *Trichoderma harzianum* for seed application. *Journal of applied microbiology*, 113: 1442-1450.
62. Stefanova, M. (2006). Aplicación de *Trichoderma* y otros antagonistas. *Fitosanidad*, 10: 2
63. Stefanova, M., A. Leiva, L. Larrinaga y M. F. Coronado (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp.* para el control de hongos fitopatógenos del suelo. [Metabolic activity of *Trichoderma spp.* isolates for a control of soilborne phytopathogenic fungi]. *Revista-Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (Venezuela)*, 16: 509-516.
64. Tripathi, P., P. C Singh, A. Mishra, P. S Chauhan, S. Dwivedi, R. T Bais y R. D Tripathi (2013). *Trichoderma*: un potencial biorremediador para la limpieza ambiental. *Tecnologías limpias y política medioambiental*, 15: 541-550.

65. Tronsmo, A. and L. G. Hjeljord (1998). Biological control with *Trichoderma* species. *Plant-microbe interaction and biological control*. Marcel Dekker Inc., New York, 14: 111-126.
66. Ulloa C. (1996). Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. En: Actas del V de Simposio de control biológico. Anais: Conferencias y Palestras. Foz de Iguazu Parana Brasil. pp. 234-238.
67. Vega, M. C. S. and M. C. I. N. Zenobio (2011). Producción de conidios de *Trichoderma harzianum* Rifai en dos medios de multiplicación. *Fitosanidad*, 15: 215-221.
68. Vinale, F., K. Sivasithamparam, E. L Ghisalberti, R. Marra, S. L Woo y M. Lorito (2008). Interacciones *trichoderma*-planta-patógeno. *Biología y bioquímica de suelos*, 40: 1-10.
69. Woo, S. L., M. Ruocco, F. Vinale, M. Nigro, R. Marra, N. Lombardi and M. Lorito (2014). Trichoderma-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8: 1.
70. Zin, N. A y N. A Badaluddin (2020). Funciones biológicas de *Trichoderma* spp. para aplicaciones agrícolas. *Anales de Ciencias Agrícolas*, 65: 168-178.