

Resumen Proyecto: Desarrollo del proceso de producción de *Trichodermas* utilizando cepas nativas, caracterizando el mejor medio de cultivo masivo y correlacionando el tipo de cepa con su correspondiente cultivo agrícola asociado.

Introducción

Lo hongos *Trichodermas* se caracterizan por predominar en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Zhang, *et al.*, 2005), pero poseen la capacidad de colonizar distintos ambientes, debido a su alta capacidad reproductiva (Bissett, 1991; Harman, *et al.*, 2004). Generalmente, este hongo es anaeróbico, habitante natural del suelo, algunas de sus especies son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas, y otras son micoparásitas. Los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, pero su crecimiento es favorecido por la materia orgánica y su humedad, la temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango de 25 a 30 °C (Papavizas, 1985). Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden y Scattolin, 1988; Jackson, *et al.*, 1991).

De manera particular, los hongos del género *Trichoderma* se pueden encontrar en la rizosfera, donde son capaces de competir por nutrientes y espacio con otros microorganismos. Además, este grupo fúngico es importante para las plantas, al contribuir en el control de hongos fitopatógenos ya que poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas, por lo que algunas especies han sido catalogadas como excelentes agentes de control biológico de hongos causantes de enfermedades para diferentes plantas hortícolas (Score & Palfreyman, 1994; Druzhinina & Kubicek, 2005; Ávila, *et al.*, 2006), razón por la cual durante los últimos años, varios investigadores y algunas empresas han mostrado gran interés en estudiar el potencial de *Trichoderma* como controlador biológico de patógenos del suelo. Las cepas de *Trichoderma* (*T*) más utilizada y reportada en la literatura para el control biológico son *T. viride*, *T. polysporum* y *T. harzianum*, la cual es la (Harman, 2000; Ávila, *et al.*, 2006).

ES importante destacar que además de un controlado biológico, las especies del género *Trichoderma* pueden producir diversos metabolitos secundarios dentro de los que se encuentran algunas toxinas como la gliotoxina (Brian, 1944; Di Pietro, *et al.*, 1992) y fitohormonas hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas (Kliefeld & Chet, 1992), también son capaces de solubilizar fosfatos, Fe, Mn, Mg para las plantas (Acurio y España, 2016). Por otro lado, los miembros del género *Trichoderma* tienen el potencial de sintetizar y liberar enzimas como polisacaridasas, celulasas, xilanasas y quitinasas, las cuales se han aprovechado en procesos industriales (Kubicek & Harman, 1998; Verma, *et al.*, 2007).

Problema

El hongo *Trichoderma sp.*, es uno de los inoculantes biológicos más empleados en los últimos años ya que posee buenas cualidades como antagonistas de hongos patógenos del suelo, actuando como hiperparásitos competitivos, así mismo debido a su ubicuidad, facilidad de aislamiento y

cultivo. Del mismo modo este deuteromycete ha demostrado poseer otras propiedades además del antagonismo, ya que se ha indicado que es capaz de inducir un mayor crecimiento en plantas tratadas, así como respuestas de defensa sistémica, lo que hace de este, un inoculante recomendable gracias a su amplio rango de acción (Chávez, 2006). Pese a las bondades que presentan *Trichoderma* y su amplia utilización en la agricultura, su uso no ha sido bien fundamentado en los aspectos científicos que de los mismos se conoce.

Nicaragua ha incursionado en la producción y uso de *Trichodermas* por medio de algunos emprendimientos privados y desde investigaciones realizadas en algunas universidades. Sin embargo, el uso indiscriminado de cepas como *Trichoderma harzianum* y su aplicación independientemente del tipo de cultivo, ha venido a generar algunas dificultades en cultivos específicos. Es bien conocido que su producción depende del medio utilizado para su crecimiento (Benites y Marroquín, 2013) y su aplicación es específica según tipo de cultivo y su relación con la especie de *Trichoderma* que se aplica (Páramo-Aguilera y Hernández-Mendoza, 2017).

Es debido a lo antes explicado, se hace evidente que para lograr una buena producción y utilización de *Trichoderma* se requiere el uso de cepas nativas, bien caracterizadas según el tipo de cultivo con el que se asocia y su producción en un medio de crecimiento que resulte lo más ventajoso posible desde el punto de vista económico, para lograr un proceso rentable, y que a su vez permita un buen desarrollo del número de esporas del hongo *Trichoderma* para su aplicación en campo.

Proceso de solución

La investigación consistió en el desarrollar de un proceso de producción de *Trichodermas*, donde se buscó y encontró el mejor sustrato orgánico que permitió la obtención del mayor número de esporas, luego se demostró a nivel de invernadero la correlación de las cepas identificadas como *Trichodermas* con los cultivos agrícolas en estudio. Para el desarrollo de la investigación, primeramente, se aislaron microorganismos de un lugar: Terrabona, Matagalpa y se trabajó con muestras previamente aisladas del laboratorio de biotecnología PIESA-UNI. Luego a las cepas aisladas en cultivos axénicos se les realizó diversos reconocimientos macro y microscópicos para determinar cuáles corresponden a cepas de hongos *Trichodermas*. Una vez las cepas caracterizadas morfológicamente, se procedió a realizar la identificación de estas por medio de la extracción del ADN genómico, la secuenciación con la empresa MACROGEN y un análisis filogenético de los hongos, lo cual arrojó finalmente resultados que permitieron encontrar la especie de *Trichoderma* a la cual correspondían.

Las cepas de *Trichodermas* previamente aisladas e identificadas, fueron reproducidas masivamente por medio de diversos sustratos orgánicos como: arroz como testigo, maíz triturado, olote de maíz triturado y copra de coco. Además, estos sustratos fueron evaluados con una variante consistente en la adición de melaza al 5%. Una vez se tuvo el sustrato completamente lleno de esporas de hongos se procedió a cosecharlas manualmente en mallas finas y a su conteo final por medio de una cámara de Neubauer.

Finalmente, con las esporas producidas se hicieron las pruebas de asociación del cultivo agrícola con la cepa del aislado de *Trichoderma* identificadas y reproducidas, para esto se estableció un diseño aleatorio, donde se montaron en bandeja de germinación semillas de tomate, chiltoma, maíz, sorgo y frijol (cultivos de interés nacional) previamente impregnadas con las esporas de cada especie de *Trichoderma*. Luego se midieron las siguientes variables para cada cultivo y especie en estudio por un periodo de tres meses: Tiempo para germinar (Días), porcentaje de germinación (%), tamaño (Cm) y peso seco del tallo (g), tamaño de raíces (Cm) y peso seco de raíces (g), estos datos serán procesados estadísticamente haciendo uso del ANOVA. Esto nos permitirá determinar la influencia positiva o negativa de la especie de *Trichoderma* analizada en asociación con un cultivo específico.

Resultados

Como producto de los aislamientos y caracterización, se logró identificar que se contaba con 5 especies *Trichoderma harzianum* (72TG-11, T1, T2, T3 y CVD-06), 1 *Trichoderma sp.* (CIXD-11) y 1 *Trichoderma longibrachiatum* (QIVD-12). De la reproducción masiva realizada a las mismas condiciones para las cepas de *Trichoderma* y los distintos sustratos (arroz como testigo, copra de coco, maíz y olote de maíz) se determinó que el olote de maíz arroja valores muy cercanos a los del arroz, como lo es en el caso del *Trichoderma harzianum* 72TG-11 donde se obtiene (sin melaza) el valor de 3.30×10^6 en arroz y 1.74×10^6 en olote; el exponencial no varía por lo que denota que el olote es un sustrato ideal para la reproducción de los hongos sin tener que utilizar alimento del ser humano (como en el caso del arroz).

Cabe mencionar que los datos de las pruebas de asociación del cultivo agrícola con la cepa del aislado de *Trichoderma* aún no han sido procesados estadísticamente para determinar la relación cepa – cultivo, pero en base a ellos se puede hacer mención que existen variaciones positivas y negativas de las variables de control de desarrollo del cultivo.

El desarrollo de esta tecnología para la producción de un agente de control biológico dio énfasis a la obtención de aislamientos nativos, ya que estos presentan un comportamiento que se adecúa a las condiciones agroecológicas regionales. (Vallejo, 2014). Existen reportes que rescatan la importancia de aislamientos nativos y su aplicación en agroecosistemas iguales o similares al que procede, en el cual *Trichoderma* debido a su adaptación a factores edáficos particulares; ya sean biológicos o ambientales actúan de una forma eficaz.

Se tomó en cuenta que las especies de *Trichoderma sp.* son muy usadas en el control biológico de hongos fitopatógenos, especialmente de aquellos que atacan a partes subterráneas de los vegetales; ejerciendo un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, haciéndolas más vigorosas, con mejor desarrollo del sistema radicular, aumentando los mecanismos de defensa de las plantas; y que además se ha demostrado que *Trichoderma sp.* también puede controlar nematodos. Por tanto

los agricultores que empleen el inóculo de las especies de *Trichoderma sp.* no solo contarán con hongos controladores biológicos de fitopatógenos, sino también de hongos nematófagos, por lo cual los costos del tratamiento de sus cosechas disminuirán, ya que solo necesitarían aplicar un solo tipo de controlador biológico que presenta ventajas, ya que están adaptados a condiciones ambientales y favorecen el desarrollo de los cultivos (Infante, *et al.*, 2009).