

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León
Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias
Departamento de Agroecología



Aislamiento y caracterización del hongo *Trichoderma* sp en suelos agrícolas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en el departamento de Chinandega 2016.

Presentado por:

➤ Br. YasiraYaoska Torrez Ortiz.

Trabajo presentado previo para optar el título de:

Ing. en Agroecología Tropical.

Tutor:

Ing. Luis Francisco Moreno Mayorga.

Asesor:

M.Sc. Patricia Castillo.

León, Octubre del 2018.

“A la Libertad por la Universidad”

AGRADECIMIENTO

Primero que todo agradecer a **Dios**, por concederme el don de la vida y el amor para estudiar, y permitirme la oportunidad de haber logrado culminar una de mis metas propuestas.

Agradezco especialmente a mi madre **Martha de la Asunción Ortiz Zapata**, y a mi abuelita **Jerónima Zapata**, por su amor, paciencia y el apoyo incondicional no solo durante estos 5 años de estudios universitarios, sino a lo largo de toda mi vida.

De igual manera agradecer a cada uno de los docentes que compartieron sus conocimientos con amor y dedicación en el transcurso de mis estudios, pero en especial a mi tutor de tesis **Ing. Luis Francisco Moreno Mayorga** y asesora **M.Sc. Patricia Castillo**, por sus conocimientos brindados durante el desarrollo de esta investigación.

Y por último, pero no menos importante, agradecer al **Ingenio Monte Rosa**, por la confianza de poner una investigación en mis manos para poder desarrollarla y así poder obtener mi título como **Ing. en Agroecología Tropical**.

YasiraYaoskaTorrez Ortiz

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico en especial a **Dios** ya que por medio de su bondad y misericordia ha permitido que me encuentre en la etapa final de mis estudios universitarios logrando así cumplir una de mis metas propuesta en mi vida.

A mi **madre**, a esa mujer que me ha dado amor, cariño, apoyo, consejos, me ha inculcado valores, ha trabajado y luchado para proveerme todo lo que necesite durante mis estudios, a mi **abuelita** que me ha ayudado de manera directa e indirectamente y todo ha sido para que pueda salir adelante y coronar una carrera profesional, y a la hermosa **familia** que Dios me ha regalado, mi **esposo** y la bendición más importante mi **hijo**, que es ese motor que me impulsa a seguir adelante y luchar en la vida, pero sobre todo que me ha llenado de felicidad.

A mis **hermanos** por su amor y cariño que nos hemos tenido y hemos estado juntos en la alegría y tristeza.

A mi **padre**, que aunque su presencia corporal ya no está conmigo, pero sé que donde quiera que Dios lo tenga, todos los días pide a nuestro padre celestial para que a mí y mis hermanos nos balla bien en la vida.

Y por último a todos **mis compañeros**, que durante estos 5 años estuvimos juntos aprendiendo cosas nuevas y aportando su granito de arena al momento de mis estudios, cuando tal vez tenía dudas en algunos trabajos y ellos bridaron sus conocimientos.

YasiraYaoskaTorrez Ortiz.

RESUMEN

El trabajo investigativo se realizó en el laboratorio de Hongos Entomopatógenos de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinaria de la UNAN-León, ubicado 1½ Km al sureste de la ciudad de León, carretera hacia La Ceiba., con el objetivo de Determinar las poblaciones de microorganismos (hongo *Trichoderma* sp) existentes en los suelos agrícolas con monocultivo de caña de azúcar del Ingenio Monte Rosa sometidos a manejos convencionales, mediante el aislamiento y caracterización del hongo *Trichoderma* sp en muestras suelos cañeros. Para la preparación de la solución madre, se tomó 1gr de suelo por muestra, las cuales fueron diluidas en 10ml de agua esterilizada, se realizaron 3 replicas por muestra, colocando 10 gotas de solución madre por plato con PDA, a los 8 días se aisló conidias del posible hongo *Trichoderma* en nuevos platos con PDA, se colocaron en el incubador a una temperatura promedio de 27° C, se realizo una observación diaria durante 8 dias para observar su crecimiento, agrupándose por las características macroscópicas y luego se vertió PDA en porta objetos para su identificación por medio de las características microscópicas (conidióforo, filiales y conidias), observando al microscopio cada 24hs durante 4 días, obteniendo como resultado que de las 27 muestras estudiadas, en 14 muestra se encontró presencia de *Trichoderma* que corresponde a un 48% de presencia. Las especies encontradas fueron: M3, R1-M10, R3-M15, R2-M24, 3-M7, R2-M7, R3-M15, R1-M19, R3-M14, R3- M12, R1 *T. koningii*, M7, R1-M23, R1- M25, R1 *T. harzianum*, M17, R1 *T. viride*, M19A, R1-M10, R2-M9, R1-M11, R1 *T. inhamatum*, M4, R3 *Trichoderma* sp.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	II
RESUMEN	III
INDICE.....	IV
INDICE TABLA.....	V
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	3
III.HIPOTESIS.....	4
IV. MARCO TEÓRICO	5
4.1 Importancia del hongo <i>Trichoderma sp.</i>	5
4.2 Biología de <i>Trichoderma</i>	5
4.2.1. Origen y taxonomía de <i>Trichoderma</i>	5
4.3 Morfología.....	6
4.3.1 Características físicas macroscópicas.....	6
4.3.2 Características físicas microscópicas.....	6
4.4 Hábitats y Requerimiento edafoclimáticos.....	7
4.5 Mecanismos de acción.....	8
4.6 Caracterización de <i>Trichoderma</i>	9
4.6.1. <i>Trichoderma koningii</i>	9
4.6.1. <i>Trichoderma harzianum</i>	10
4.6.1. <i>Trichoderma viride</i>	11
4.6.1. <i>Trichoderma inhamatun</i>	12
4.7. El medio de cultivo PDA.....	12
4.8. Producción de <i>Trichoderma</i> en laboratorio.....	12
4.8.1. Pasos previos a la producción.....	12
4.8.2. Producción comercial de <i>Trichoderma</i>	14
V. MATERIALES Y METODOS	16
5.1 Ubicación del estudio	16
5.2 Tipo de investigación	16
5.3 Manejo del ensayo	16
5.3.1 Colecta de la muestra.....	16
5.3.2 Aislamiento del hongo.....	18
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	21
6.1 Comportamiento de las poblaciones del hongo <i>Trichoderma</i>	21
6.2 Caracterización de las especies de <i>Trichoderma</i> encontradas en las muestras de suelo de la empresa Monte Rosa, Junio y Agosto del 2017.	25
VII. CONCLUSIONES	31
VIII. RECOMENDACIONES	32
IX BIBLIOGRAFIA.....	33
X ANEXOS	36

Índice de tablas y gráficos

Tabla 1: Distribución de las muestras por municipios.....	19
Gráfico 1: Consolidado de presencia o ausencia del hongo <i>Trichoderma sp</i> en las muestras de suelos cañeros de la empresa Pantaleón. Junio y agosto 2017.....	21
Gráfico 2: Porcentajes de la presencia o ausencia del hongo <i>Trichoderma sp</i> en las muestras de suelo cañeros de la empresa Pantaleón. Junio y agosto del 2017.....	22
Gráfico 3: Frecuencia de la presencia del hongo <i>Trichoderma sp</i> por cultivo en la empresa Pantaleón. Junio y agosto del 2017.....	23
Gráfico 4: Comportamiento de la presencia del hongo <i>Trichoderma sp</i> por años de usos de los suelos en la empresa Pantaleón. Junio y agosto del 2017.....	24
Tabla 2: Especies de <i>Trichoderma</i> encontradas por muestras y cultivo en suelos de la empresa Pantaleón. Junio y agosto del 2017.....	25
Tabla 3: Distribución y descripción de las 27 muestras de suelo recolectadas de los suelos agrícolas de la empresa Pantaleón. Junio y agosto del 2016.....	38

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura convencional con el pasar de los años ha aumentado el uso de los productos sintéticos con el fin de eliminar las plagas y enfermedades que se presentan en los cultivos, lo que ha provocado, la resistencia de estos y en ocasiones la aparición de nuevas plagas y enfermedades, recurriendo a productos más fuertes, ocasionando la pérdida de microorganismos del suelo y un ciclo vicioso del uso de plaguicidas.

Por otra parte la agricultura orgánica o producción agroecológica propone, tanto para el mantenimiento de la vida del suelo, como para el manejo de plagas y enfermedades, la conservación del principio de la biodiversidad a través de la implementación de agroecosistemas altamente diversificados, el uso de plantas repelentes, la asociación y rotación de cultivos, el uso de insectos benéficos (predadores o parasitoides), entomopatógenos (hongos, virus y bacterias), hongos antagonistas, insecticidas y fungicidas de origen botánico, permitiendo la utilización de algunos productos químicos, de manera que esto contribuya a conservar el equilibrio ecológico, manteniendo la actividad biológica del suelo, fortaleciendo los tejidos de las plantas para que soporten ataques de insectos y patógenos (Cholango, 2009).

El hongo *Trichoderma sp* se encuentra de manera natural en suelos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, en los rastrojos, raíces las cuales son colonizadas rápidamente y hasta en la parte vegetativa del cultivo.

Para que *Trichoderma sp* se desarrolle adecuadamente existen factores ambientales tales como: la temperatura, que tiene su óptimo de crecimiento alrededor de los 25 y 30°C, la humedad del medio (sustrato), ésta podría encontrarse en un rango que oscila entre el 20% y el 70% de humedad, el pH es relativamente amplio, valores de pH están comprendidos entre 2.0 y 9.0, con un intervalo de pH óptimo que se encuentra entre 4.0 y 7.0.

Se tienen reportes que *Trichoderma sp* induce el crecimiento vegetal al degradar el epispermo de la semilla e interviene en los procesos respiratorios durante la germinación. Acelera, además, el desarrollo de los tejidos meristemáticos primarios, los cuales aumentan el volumen, la altura, así como el peso de la planta (Moity, 1982; Miranda *et al.*, 1998; Gravelet *al*, 2007; Shores y Harman, 2008a; Shores y Harman, 2008b) citado por

Hernández, et al., 2011. También incrementa el crecimiento de raíces y su desarrollo, productividad del cultivo, resistencia a estrés abiótico y la toma y uso de nutrientes (Arora y Elander, 1992) citado por Benítez 2004. Se han observado que muchas cepas de *Trichoderma* son capaces de inducir resistencia sistémica en las plantas, ya que, aplicadas en la rizósfera, producen protección contra patógenos de suelo (Yedidia et al., 1999), citado por Tovar, 2008.

Trichoderma sp es un eficiente controlador biológico, ya que puede colonizar sustratos rápidamente, promover el crecimiento vegetal y posee una gran actividad antagónica contra un amplio rango de hongos patógenos entre las que se encuentran *Rhizoctoniasolani*, *Sclerotiumrolfsii*, *Pythiummultimum* y *Fusarium oxisporum*, siendo estas causantes de enfermedades en los cultivos.

Es por eso que con el siguiente trabajo investigativo se pretende identificar y determinar las poblaciones de microorganismo (hongo *Trichoderma* nativo) que existen en estos suelos cañeros que han sido controlados y manejados en un sistema convencional, y si existen altas poblaciones del hongo *Trichoderma* en un futuro pueden ser aislado para su reproducción y utilización como un fungicida biológico, para controlar enfermedades producidas por hongos en estas zonas productoras de caña.

II. OBJETIVOS

General

- Determinar las poblaciones del hongo benéfico *Trichoderma* sp existentes en los suelos agrícolas con monocultivo de caña, sometidos a manejos convencionales, Chinandega 2017.

Específicos

- Aislar el hongo benéfico *Trichoderma* sp en muestras de suelos cañeros sometidos a manejos convencionales, Chinandega 2017.
- Caracterizar el material aislado del hongo benéfico *Trichoderma* sp en las muestras suelos cañeros sometidos a manejos convencionales, Chinandega 2017.

III. HIPÓTESIS.

Hipótesis de Investigación:

- El manejo convencional de la caña de azúcar influye en la sobrevivencia de los microorganismos benéficos presentes en el suelo.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Importancia del hongo *Trichoderma sp.*

Las especies de *Trichoderma sp* han sido investigadas como agentes de control biológico de enfermedades fúngicas por cerca de 70 años, pero es solo recientemente que las cepas han comenzado a ser comercialmente aprovechables. El éxito de las cepas de *Trichodermasp* como agente de control biológico es debido a su alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizósfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos y eficiencia en promoción de crecimiento en plantas e inducción de mecanismo de defensa, según Benítez y Rincón 2004, citado por Tovar, 2008.

El hongo *Trichoderma sp* es un eficiente controlador biológico que está siendo ampliamente usado en agricultura como agente de biocontrol debido a su habilidad para colonizar sustratos rápidamente, inducir resistencia sistémica adquirida en plantas, promover el crecimiento vegetal y poseer actividad antagonica contra un amplio rango de hongos patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium ultimum* y *Fusarium oxisporum*, causantes de enfermedades importantes en los cultivos. El efecto inhibitorio de sus antibióticos y la degradación de componentes de la pared celular de patógenos de plantas, es citado como aspecto importante de su actividad antagonista.

Las diferentes especies de *Trichoderma sp* se caracterizan por tener un crecimiento micelial rápido y una abundante producción de esporas que ayudan a la colonización de diversos sustratos y del suelo, así mismo pueden producir enzimas extracelulares, antibióticos antifúngicos, ser competidores contra hongos patógenos, promover el crecimiento en plantas, e inducir resistencia , además compiten muy bien por nutrientes, son micoparásitos muy activos y son competidoras muy eficiente de la rizósfera (Papavizas, et al., 1985; Ahmand y Baker, 1987) citado por Tovar, 2008.

4.2 Biología de *Trichoderma* sp.

4.2.1. Origen y taxonomía de *Trichoderma* sp.

Según Grondona, 1997, citado por Chávez, 2006, el género *Trichoderma* fue descrito por Person hace casi 200 años y consiste de hongos anamórficos aislados principalmente del suelo y de materia orgánica en descomposición.

El género *Trichoderma* se ubica de la siguiente manera: Reino, Mycetae (fungi); división, Eumycota; subdivisión, Deuteromycotina; clase, Hyphomycetes; Orden, Hyphales (Moniliales) y familia, Moniliaceae, basado en la clasificación taxonómica de Alexopoulos y Mims (1979) y Subramanian (1983), citado por Michel, 2001.

4.3 Morfología.

4.3.1. Características físicas macroscópicas.

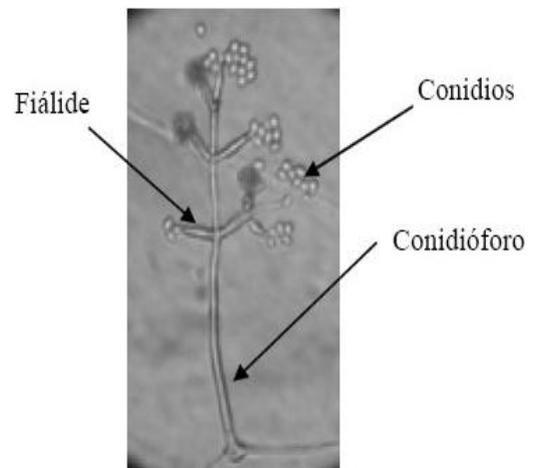
Las colonias se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración, blancas - verdes, amarillo - verdosas; las áreas con conidios se presentan con anillos concéntricos, (Arango, 1988; Barnett & Hunter, 1972) citado por Chávez, 2006.

El revés de las colonias es usualmente no coloreado, amarillo, amarillo -verde, y muchas especies producen grandes cantidades de clamidosporas en cultivos sumergido (Howell, 2003), citado por Chávez, 2006.

4.3.2 Características físicas microscópicas.

El género *Trichoderma* sp en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios, citado por Infante, Martínez, *et al* 2013.

Los conidióforos son erectos, hialinos, en su mayoría ramificada, no verticilada, los cuales pueden ser



solitarios o en grupos. Las fiálides son en forma de botella, únicas o en grupos, hinchadas en la región central pero delgada hacia el ápice; son hialinas y en ángulo recto con respecto a los conidióforos. Los conidios (3 a 5 μm) son unicelulares subglobosas u oblongas, lisas o equinuladas, hialinas o verdes y ocurren en masas en los ápices de las fiálides y de rápido desarrollo en medios sintéticos (Arango, 1988; Barnett & Hunter, 1972) citado por Chávez 2006.

Las esporas son los más viables de los propágulos empleados en programas de biocontrol. Estos cuerpos especializados se caracterizan por poseer una gruesa pared exterior, constituida por tres capas (endospora, epispora y perispora) que protegen el interior del conidio (protoplasto). La ventaja del conidio de poseer una pared celular gruesa es la posibilidad de aislarlo de su medio natural y que sobreviva a condiciones adversas, manteniéndolo en dormancia hasta que las condiciones sean propicias para la germinación (Álvarez y Sivilay, 2013).

4.4 Hábitats y Requerimiento edafoclimáticos.

Trichoderma sp se encuentran en diferentes hábitats y suelos, la presencia de varias especies difiere entre hábitat y están influenciadas por las condiciones ambientales. Se pueden encontrar en el aire, partes aéreas de plantas, pero especialmente en suelos, incluyendo humus forestales y de madera en descomposición. Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos (Domsch, 1980), citado por Chávez, 2006.

Las condiciones ambientales y edafológicas adecuadas para el hongo *Trichoderma sp* son las siguientes:

- La **temperatura** de crecimiento óptima es de 25 $^{\circ}\text{C}$, si bien el rango de crecimiento está entre 15 y 35 $^{\circ}\text{C}$, por debajo o encima de esta temperatura, pero hay otras especies que pueden llegar a tolerar hasta los 41 $^{\circ}\text{C}$ como lo son la *T. pseudokoningii* y *T. saturnisporum*, citado por Méndez y Reyes, 2009.
- Las condiciones de **humedad** adecuada están entorno al 70% de la capacidad de retención hídrica, si bien es capaz de crecer entre el 20-80%.

- El **pH** es importante para manipular tanto el crecimiento, como la esporulación y la mayor longevidad, se obtiene en un medio con pH de 6.0 y permanecen viables las esporas un período de 45 días en almacén. Bajo condiciones de campo requiere humedad relativa alta para sobrevivir más tiempo (Agosin, *et al*1997) citado por Michel, 2001.
- **Salinidad:** Se puede presentar o no crecimiento al ser expuesto a determinadas concentraciones de sales, así como a CaCl₂, debido a que en concentraciones mayores a 80g/l inhibe el crecimiento, 60g/l tiene un desarrollo mínimo y a 10g/l puede desarrollarse de manera óptima. Frente a sales como a NaCl y KCl es difícil su crecimiento, ya que los iones Na y K inhiben su esporulación disminuyendo la presión osmótica de la célula lo que conlleva a la disminución de la esporulación (Simkovic et al., 2008), citado por Michel, 2001.

Es un microorganismo anaeróbico facultativo, lo que le confiere la capacidad de actuar tanto en condiciones de aerobiosis (suelos muy porosos), cuyas condiciones son óptimas para su crecimiento. *Trichoderma sp* también puede crecer en medios con elevada actividad microbiana, puntualmente deficientes en oxígeno.

Se presentan diferencias entre especies del género de acuerdo al tipo de suelo, temperatura y contenido de humedad y no sólo se encuentra una sola especie. Roiger,*et al.*, 1991, al cuantificar poblaciones de *Trichoderma sp*, en suelos asociados a árboles de manzano en Wisconsin, EU., se logra encontrar *T. hamatum*, *T. harzianum* y *T. koningii*, como las especies más abundantes y en menor proporción *T. virens* y *T. viride*; de hecho, ésta última especie está adaptada a suelos y climas fríos y su población se incrementa, conforme aumenta la altura sobre el nivel del mar, mientras que, *T. harzianum* todo lo contrario, es decir, disminuye su población. No hay evidencia de la espacialidad de los miembros del género en zonas bajas, medias y altas (Smith, 1995), citado por Michel, 2001.

4.5. Mecanismos de acción.

Trichoderma sp presenta distintos mecanismos de acción para ejercer su antagonismo, dependiendo de las características de la cepa de *Trichoderma sp*, del patógeno y las condiciones ambientales:

a) Micoparasitismo:

Este proceso incluiría el crecimiento del antagonista hacia el patógeno, desarrollándose alrededor de éste o formando estructuras similares a ganchos o apresorio en la superficie del hospedero, que le permitirían, penetrar al interior (del patógeno) y por acción de enzimas líticas (quitinasa y β -1,3 glucanasa) degradar su pared celular.

b) Competencia:

El desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio.

c) Antibiosis:

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para los microorganismos patógenos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.). Estos metabolitos volátiles y no volátiles, son del tipo antibiótico como: viridín, trichodermin, glioviridin, gliotoxin y harzaniolide. De todas estas micotoxinas la más representativa es Trichodermin que actuaría inhibiendo la actividad ribosomal de los patógenos,(Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991) citado por Álvarez y Sivila, 2013.

4.6. Caracterización de *Trichoderma sp.*

Las colonias de *Trichoderma sp* se reconocen primeramente en base a sus características morfológicas de manera macroscópica y microscópica.

4.6.1. *Trichoderma koningii.*

➤ Características macroscópicas.

Trichoderma koningii se distingue por sus colonias, inicialmente se ven como superficie lisa, pero la formación de esporas aéreas a través del tiempo, permite observarlas ligeramente algodonosa (Rifai, 1969). El color de las colonias cambia gradualmente de

blanco a blanco verdoso por la formación de fialospora que en última instancia se torna de un color verde oscuro opaco (Domschet *al.*, 1980). Así mismo, las colonias de *T. koningii* crecen rápidamente bajo condiciones favorables de temperatura (20⁰ C – 25⁰ C) con temperatura optima de 25⁰ C y un periodo de incubación de 5 días con luz constante y un pH entre 3.7-6.0 (Domsch, *et al.*, 1980, citado por Cruz, 2007).

➤ **Características microscópicas**

Trichoderma koningii es un hongo imperfecto que posee hifas hialinas septadas y ramificadas a ambos lados sin ser paralelas, conidióforos, fiálides y conidios; aunque también pueden producirse clamidosporas. Sus estructuras de reproducción son los conidios, mientras que sus estructuras de resistencias son las clamidosporas, siendo de 5 a 10 veces más grandes que los conidios; son intercalares o terminales, de forma cilíndricas o globosas.

Los conidióforos son hialinos, al inicio de su desarrollo se observan ramificados, pero cuando maduran comienzan a separarse por su formación aérea, son rectos y pueden llegar a presentar aspecto piramidal. Las fiálides son hialinas, en forma de frascos o botellas, e infladas en la base y están unidas a los conidióforos en ángulo recto. Los conidios son redondeados o de forma ovoide, lisos y se observan hialinos o de color verde brillante al microscopio (Rifai, 1969, citado por Cruz, 2007).

4.6.2. *Trichoderma harzianum*.

Rifai en 1969, revisó el género *Trichoderma* después que se introdujo por Person entre las que se encuentra *Trichoderma harzianum*, citado por Infante, 2009.

➤ **Características macroscópicas.**

Las colonias se reconocen fácilmente por su rápido crecimiento y sus coloraciones son: blancas – verdes o amarillo – verdosas; las áreas con colonias se presentan con anillos concéntricos. El revés de las colonias es usualmente de colores, amarillo, ámbar o amarillo – verde.

➤ **Características microscópicas.**

Sus Conidióforos. Son erectos, hialinos, no verticilados, en su mayoría ramificados, parecen un árbol pequeño con un sistema de ramas irregulares de manera piramidal y pueden estar solitarios o en grupos, sus fiálides son en forma de botella, pueden estar solas o en grupos, hinchada en la región central pero delgada hacia el ápice: son hialinas y en ángulo recto con respecto a los 7 conidióforos. Es donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies.

Los conidios son esporas asexuales de color verde – amarillo – blanco, con esporulación densa que aseguran la generación del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas, su pared está compuesta por quitina y glucanos, su función es la reproducción rápida, dispersión y supervivencia (Infante, et al., 2009).

4.6.3. *Trichoderma viride*

Fue la primera especie de *Trichoderma* descrita por Persoon en 1974.

➤ **Características macroscópicas**

Las colonias de *T. viride* a 20°C pueden alcanzar un diámetro de 7,5cm en 5 días. Estas durante su crecimiento micelial toman una coloración blanco amarillosa y más tarde se observan blanco-verdosas con insertos de conidios en tonos verde oliva la textura es correosa. Cuando las condiciones no son favorables, presenta estructuras de resistencia identificables por ser blancas y correosas. Este puede o no presentar pigmento difusible al medio durante su crecimiento (González *et al.*, 2.000; Samsonet *al.*, 2.004,citado por Vásquez 2010).

➤ **Características microscópicas.**

Hifas de pared rugosa, hialinas, ramificadas, septadas que dan origen a conidióforos ramificados irregularmente piramidales, posee fiálides agrupadas (entre 2 y 4), en forma cilíndrica. Los conidios presentan una pared rugosa típicamente de forma globosa y rara vez elipsoidal, miden de 3,6-4,8 µm. En condiciones no favorables presenta clamidosporas terminales y/o intercalares (Samsonet *al.*, 2.004, citado por Vásquez 2010).

4.6.5. *Trichoderma inhamatum*.

➤ Características macroscópicas.

Presenta las características de un crecimiento algodonoso blanquecino que se compactan con el tiempo. El crecimiento empieza con un color blanco algodonoso, continúa el crecimiento como un halo de tonalidad verde con una apariencia de anillos continua un color blanquecino y a continuación un segundo halo color verde hasta completar la caja Petri.

➤ Características microscópicas.

La morfología vista al microscopio corresponde a hifas hialinas septadas, formando un ángulo de 90° sus conidios son hialinos, las fiálides son hialinas están dispuestas en racimos y producen los conidios en el extremo. Sus conidios son unicelulares de forma redonda (García, *et al.*, 2016).

4.7. El medio de cultivo PDA.

Papa-Dextrosa-Agar (PDA) es medio de cultivo sólido muy común que se utiliza para aislar todo tipo de hongo entre los que se encuentran los hongos saprofitos que crecen muy bien y esporula en este medio.

Para su preparación es necesario lavar, pelar y cortar 300gr de papas, ponerlas a hervir en un 1.5 lt de agua por 20 min., colar y disolver en el líquido 20gr de Agar y 20gr de Dextrosa. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (Cañedos, Ames, 2004).

4.8. Producción de *Trichoderma* en laboratorio.

4.8.1 Pasos previos a la producción.

a. Aislamiento

Salir a campo y coleccionar muestras de suelos o raíces, también puede obtenerse de plantas o medios artificiales como PDA, cuando las cepas se adquieren de otro laboratorio. Este paso

debe hacerse bajo estrictas normas de higiene y asepsia, ya que es el primer paso de todo el proceso productivo. El aislamiento se puede hacer de manera directa o dilución seriada.

b. Aislamiento directo.

Consiste en colocar 10gr de suelo, en un recipiente (tubo de ensayo) que contiene 10ml de agua esterilizada y agitar durante 1 min, a esta suspensión la llamamos solución madre. Para realizar la siembra de la muestra en los platos petri con PDA. Se colocan 1ml de la solución madre y se esparce sobre todo el plato. Luego se coloca en un incubador a temperatura ambiente durante 6 días. En este último proceso se observa el crecimiento de micelio y la producción de conidias.

c. Preparación de matrices.

Una vez ya crecido el hongo, y obtenido el cultivo puro, se procede a elaborar las matrices. Para la obtención de matrices, se siguen los siguientes pasos:

- **Preparación de sustrato.**

Pesar 200 gr de arroz blanco, grano entero (80/20), revisar y separar las impurezas de gran dimensión, lavar con abundante agua, 3 veces preferiblemente, posteriormente se pone a pre cocer en una olla con agua a una temperatura de 70 °C, durante 20-30min. Realizando observaciones constantemente para que el arroz quede suave pero no recocado.

En seguida se pone a escurrir el arroz con un colador para quitar el exceso de agua y ponerlo a enfriar sobre papelógrafo durante 20-30 minutos, se le colocan 200 ml de arroz en el erlenmeyer y se sella con papel aluminio y masking-tape. Luego se coloca en el autoclave, a una temperatura de 250° C o 15 libras de presión, durante 20 minutos, dejar enfriar.

- **Inoculación de matrices.**

En ½ litro de agua se le agrega 1 cápsula de amoxicilina, se mezcla, se sella y se coloca en el autoclave durante 20 minutos a 250°C. Una vez ya fría el agua se le agrega cultivo puro del hongo (conidias) y se agita fuertemente durante 1 minuto. Con una jeringa se le inyecta

15 ml del inóculo a las matrices, se agita el arroz para poder distribuir muy bien el inóculo, y obtener un crecimiento homogéneo.

- **Incubación**

Se colocan en el incubador a temperatura ambiente, durante 7 días. Revisar cada 24 horas, para evitar o detectar una posible contaminación. Para su conservación a los 8 días después de la siembra, donde ya se logra ver un buen crecimiento del hongo en las matrices, estas se pueden mantener en refrigeración, para prolongar su conservación (Funica).

4.8.2. Producción comercial de *Trichoderma*.

- **Preparación del sustrato (1 dosis de 300gr):**

Pesar 300gr de arroz blanco, grano entero (80/20), quitar las impurezas de gran dimensión, lavar con abundante agua, 3 veces preferiblemente, luego se pone a pre cocer en una olla con agua a una temperatura de 70°C, durante 15-20min. Realizando observaciones constantemente para que el arroz quede suave pero no recocado.

Luego con un colador se escurre el arroz para quitar el exceso de agua y ponerlo a enfriar sobre papelógrafo durante 20-30 minutos, luego se colocan 300 gramos de arroz en la bolsa, para el cierre de las bolsas se le dobla 3 veces la abertura evitando que le queden demasiado aire y se engrapan para sellarlas.

Una vez que las bolsas estén selladas, se proceden a acomodar en el autoclave, esperara que eleve a una temperatura de 250° C o 15 libras de presión, y mantener arriba de este nivel durante 20 minutos y dejar enfriar.

- **Inoculación.**

Para la inoculación, es importante limpiar la cámara de flujo laminar con hipoclorito de sodio al 0.1%. Posteriormente en ½ litro de agua se le agrega 1 cápsula de amoxicilina, se mezcla, se sella y se coloca en el autoclave durante 20 minutos a 250° C.

Una vez ya fría el agua se le agrega 10 cucharadas de sustrato (arroz con crecimiento de *Trichoderma*) y se mezcla bien hasta que la solución tome un color verde intenso o se desprendan las esporas del arroz. Luego a las bolsas con la ayuda de una jeringa se le inyecta 10 ml de inóculo, se sella la bolsa con cinta masking tape y se le escribe la fecha de inoculación.

Después de ser inoculadas las bolsas, se agitan las bolsas para esparcir homogéneamente el inóculo del hongo en el sustrato (arroz).

➤ **Incubación.**

Una vez inoculadas, las bolsas se trasladan al incubador a 25° C, se dejan en plena oscuridad durante 72 horas. Pasada las 72 horas se les da un leve movimiento cuando dentro de la bolsa se forma un cuerpo compacto y un gran crecimiento de micelio. Luego se debe de sacar del incubador y dejar que continúe el crecimiento del hongo. El segundo movimiento se da a los 7-8 días, después de ser inoculado.

➤ **Secado y cosechado.**

Este proceso se realiza cuando las bolsas en crecimiento han tomado un color verde uniforme, color característico de las cepas. En caso de que haya un crecimiento deficiente, la bolsa debe ser puesta a secar a los 8 días después de ser inoculados, bajo estas condiciones no se recomienda dejar más tiempo ya que no habrá más crecimiento y perderá lo poco que ha esporulado.

El secado debe hacerse en un lugar donde circule aire fresco y seco, evitar que la temperatura eleve más de 28° C, así, como la exposición directa del sol, durante el sacado. Se debe levantar el arroz cuando muestre una humedad menor de 8% y embolsar.

El producto cosechado se debe de mantener en refrigeración, para mantener la calidad y asegurar la viabilidad de las esporas (Guzmán, 2010).

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Ubicación del estudio.

Las muestras fueron tomadas de los suelos agrícolas del Ingenio Monte Rosa ubicado en el km148.5 carretera a Potosí, de la ciudad El Viejo departamento de Chinandega, dónde la temperatura promedio es de 21 a 30⁰ c, una altura de 70.42 msnm, el suelo es franco arenoso con una pendiente del 1% con una latitud de 12°, 42min 15.4segundos y una longitud de 87°, 13min, 55.5segundos, en esta zona es predominante el clima tropical seco.

5.2. Tipo de investigación.

Es una investigación descriptiva ya que es un método en el cual solo se observa el comportamiento de la variable en estudio este caso el hongo *Trichoderma*, y describir el comportamiento sin influir sobre él de ninguna manera.

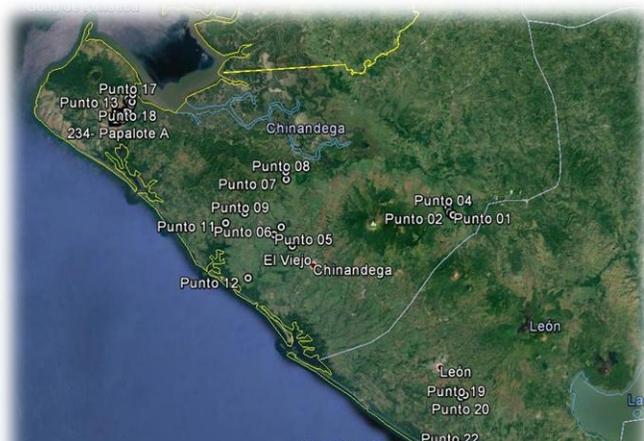


Imagen 1. Ubicación de muestras en los cultivos de caña de azúcar del Ingenio Monterrosa ubicados en los municipios de León y Chinandega

5.3. Manejo del ensayo

5.3.1 Colecta de las muestras.

La colecta de las muestras se inició en el mes de junio del 2016, en los lotes del Ingenio Monte Rosa donde se tiene establecido el cultivo de caña de azúcar. La cantidad de las muestras se definió de acuerdo al total de manzanas por área.

Una vez seleccionada los puntos de muestreos, se utilizó el método de zig-zag para la extracción de las muestras, a partir del primer punto se contaron 60 pasos para el siguiente punto de muestreo y así sucesivamente hasta cubrir toda el área de muestreo.

En cada punto las muestras fueron extraídas con palas a una profundidad de 5-10 cm y se tomaron muestras de 5 cm de suelo con raíces.

El total de puntos muestreados por parcela fueron entre 3-5 puntos. Las muestras se homogenizaban y se depositaron en bolsas de diez libras y se codificaron con las especificaciones siguientes: Código de la muestra, fecha de toma de muestra, comunidad, sector, nombre del lote, código de la zona, cultivo principal, edad del cultivo principal, aplicación de fertilizante y aplicación de plaguicidas, estas muestras se llevaron al laboratorio de Hongos Entomopatógenos del Centro de Investigación y de Reproducción de Controladores Biológicos CIRCB.

El total de muestras tomadas fueron 27. El área de muestreo es aproximadamente 597 manzanas, sin incluir las áreas de los municipios de Monte Rosa y Tonalá. (Ver tabla 1). En estos lotes el cultivo de caña de azúcar tiene un desarrollo fenológico entre 3 a 8 meses, también se realizó muestreo de suelo en 5 lotes donde se practicó la quema para cosecha de caña de azúcar, estos lotes ya tenían un crecimiento fenológico de 3 meses.



Imagen 2. Proceso del muestreo y Diversidad de las condiciones edáficas

En estas imágenes se muestran la diversidad de condiciones edáficas que presentan los distintos lotes en el cual se tomaron muestras de suelo.

Tabla 1: Distribución de las muestras por municipio

Municipios	N _o muestras/ Municipio	Área (mz)
La Villa 15 de Julio	5	258.47
El Viejo	12	162.62
León	3	80.44
Monte Rosa	6	*
Tonalá	1	*
	27	501.53

*. Datos no proporcionados por la empresa.

En la tabla 1 se muestra el total de muestra, la distribución y el área de producción por municipio, logrando cubrir 5 municipios del occidente de Nicaragua, colectándose el mayor número de muestras en el municipio El Viejo con 12 muestras y en el municipio de Tonalá con la menor cantidad de muestras con solamente 1 muestra.

5.3.2 El aislamiento del hongo

Se realizó en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del Centro de Investigación y de Reproducción de Controladores Biológicos CIRCB.

➤ Esterilización de materiales

Primeramente, se procedió a lavar con detergente y cloro al 3% todos los platos petri, tubos de ensayos, micro pipetas, erlenmeyer, porta objetos y cubre objeto, que serán utilizados durante el proceso de aislamiento y caracterización

Los platos petri se esterilizaron, previamente fueron envueltos con papelógrafo en paquetes de 10 platos con su respectiva tapa, sellándose con cinta adhesiva, para meterlos en bolsas plásticas de 12lb comúnmente llamadas verduleras, se amarraron para posteriormente ser introducidas a la autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 250° C.

Para la esterilización del agua, se colocaron 10ml de agua en los tubos de ensayo sellados e introducidos en la autoclave durante 20 minutos a 250° C de temperatura.

➤ **Preparación del medio de cultivo**

Para la preparación del PDA se pesaron 300gr de papa y pelaron. Luego se vertió 1.5lt de agua en una olla que se colocó en la cocina a fuego medio, cuando iniciaba a hervir se colocaron las papas y se dejó durante 20-25 min aproximadamente. Después se coloca algodón en un embudo que servirá como filtro para evitar residuos de papa, y se procedió a verter la infusión de papa en un Erlenmeyer y se dejó enfriar. Al litro de infusión se le agregó 20gr de Agar, 20gr de dextrosa y antibiotico de 0.5gr (para evitar el crecimiento de bacterias), mezclados en el momento de su incorporación a la suspensión, luego se selló con papel aluminio y cinta adhesiva para ser introducido en el autoclave (olla de presión), a una temperatura de 250°C, se dejó durante 20min y se apagó.

➤ **Preparación de las muestras**

De las muestras que fueron colectadas en campo se procedió a pesar 1g de suelo y se agregaron a 10ml de agua esterilizada, se agitaron hasta obtener una mezcla homogénea, (solución madre), luego con una micro pipeta se colocaron 10 gotas de solución en cada plato Petri con PDA, de cada una de las muestras se realizaron 3 réplicas las cuales fueron rotuladas con el Node la muestra, el No de réplica y la fecha en la que se estableció.

Para la Incubación de las muestras, se colocaron en el incubador a una temperatura promedio de 27°C y un 75% de humedad, se realizó una observación diaria para poder caracterizar el crecimiento de las colonias del hongo, observar el color y la esporulación. Luego las muestras fueron agrupadas por las características antes mencionadas para su posterior identificación (Ver anexo fig. 6).

➤ **Caracterización de las muestras**

Para poder lograr caracterizar el hongo, se basó en las características morfológicas, por lo cual fue necesario observar en primera instancia, el crecimiento y coloración de las colonias, que estaban en los platos petri, agrupando los platos que presentaban las mismas características físicas, luego se observó a nivel microscópico las diferencias morfológicas como el tipo de ramificación del conidióforo, la forma y agrupación del conidio y para esto se vertió PDA en porta objeto, luego se tomó una pequeña muestra de conidias y se colocaron en el PDA, luego se le puso el cubre objeto al momento de la observación al

microscopio y se aislaron durante 96 horas, realizando observaciones cada 24 horas para determinar la especie del hongo *Trichoderma*.

Para caracterizar *Trichoderma koningii* se utilizó un trabajo realizado por Lina Cruz en 2007, en la ciudad de Bogotá, Colombia, para *Trichoderma harzianum* se utilizó un trabajo realizado por Infante, et al. 2009, para *Trichoderma inhamatum* se utilizó como guía un estudio realizado por García, et al., 2016 y para caracterizar *Trichoderma viride*, se utilizó el trabajo de Vázquez, 2010.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En los resultados que a continuación se muestran, observamos la presencia de *Trichoderma sp* en suelos cañeros del Ingenio Monter Rosa de la empresa Pantaleón, evaluados entre junio y agosto del 2017.

6.1 Presencia o ausencia de las poblaciones del hongo *Trichoderma sp*

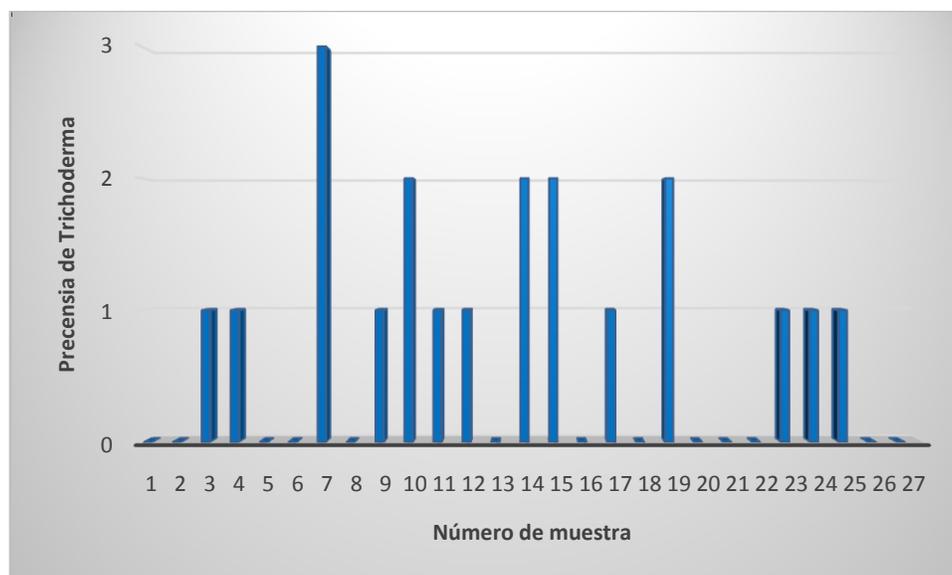


Gráfico N0. 1 Consolidado de presencia o ausencia del hongo *Trichoderma sp* en las muestras de suelo cañeros de la empresa Pantaleón. Junio y agosto del 2017.

En el gráfico 1, se observa el consolidado de la presencia de *Trichoderma* en las 3 réplicas por muestras estudiadas, en la cual se observa que la muestra número 7, presenta la mayor presencia de *Trichoderma*, encontrando *Trichoderma* en las 3 réplicas, seguida de las muestras 10, 14, 15 y 19 que se encontró presencia de *Trichoderma* en 2 réplicas de las muestras estudiadas.

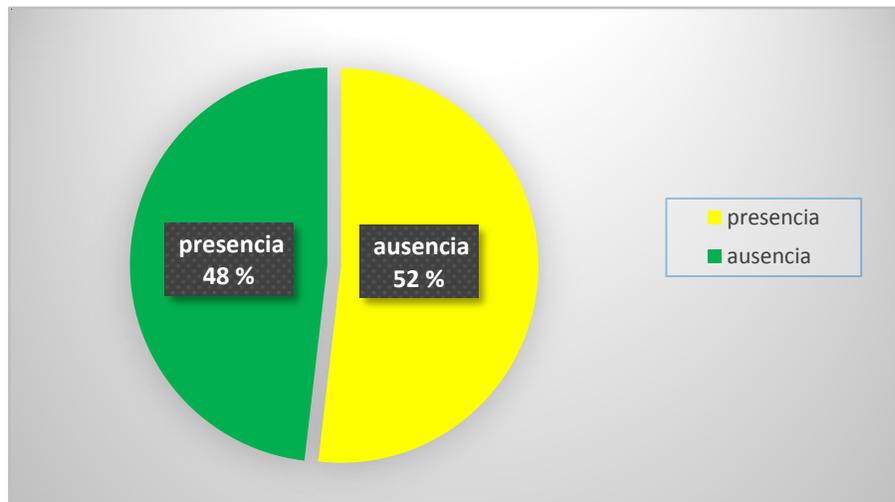


Gráfico N0. 2 Porcentajes de la presencia o ausencia del hongo *Trichoderma sp* en las muestras de suelo cañeros de la empresa Pantaleón. Junio y agosto del 2017.

En el gráfico 2, se observa el porcentaje de la presencia y por consiguiente la ausencia del hongo *Trichoderma*, en la cual se obtuvo un 48% de presencia del total de las muestras estudiada, quedando por debajo de la ausencia que obtuvo un 52 %, pero que el porcentaje de presencia quedara por debajo de la ausencia puede ser debido a diferentes factores entre los que se encuentran: manejo agronómico convencional y dejar el suelo desprotegido (sin rastrojos) después de la cosecha, evitan que las colonias de *Trichoderma* existentes de manera natural en el suelo puedan crecer y esto tiene relación con lo que nos describe Samuels, 1996 y Kuhls et al., 1997 citado por Chávez, 2006, que la presencia de *Trichoderma* se va a encontrar en suelos con rastrojos y madera en descomposición y si no se encuentran ningunas de estas condiciones no se podrá encontrar presencia de *Trichoderma*.

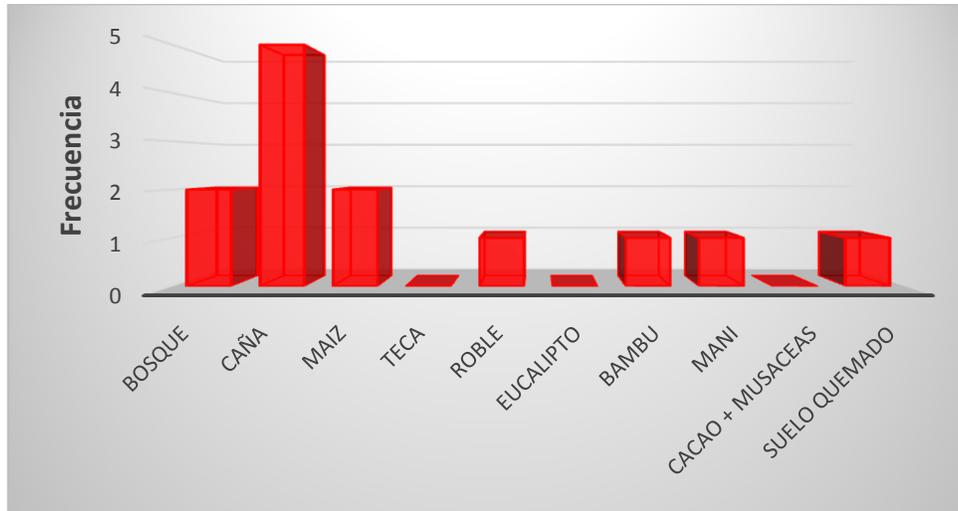


Gráfico N0. 3Frecuencia de la presencia del hongo *Trichoderma sp* por cultivos en la empresa Pantaleón. Junio y agosto del 2017.

En el gráfico número 3, se muestra la frecuencia con que se encuentra *Trichoderma* en los diferentes cultivos de donde se rastrearon las muestras estudiadas, en la cual el cultivo de caña presenta la mayor presencia del hongo con 5 muestras, seguidas de los cultivos maíz y el área de bosque con 2 muestras cada una, y en el área donde se tiene establecido las especies arbóreas de teca, eucalipto y cacao + musácea no se encontró presencia del hongo *Trichoderma*.

La alta presencia del hongo en el cultivo de caña está relacionado con lo que refiere Harman *et al.*, 2004 citado por Tovar, 2008 la cual nos dice que las cepas de *Trichoderma* están siempre asociadas con raíces de plantas y ecosistema de raíces. Y según Baylis (1975) citado por Nicoya, *et al.*, 2017 refiere que el tipo de raíz de las gramíneas es “tipo graminoides”, muy ramificado, con abundantes y pelos radicales largos,

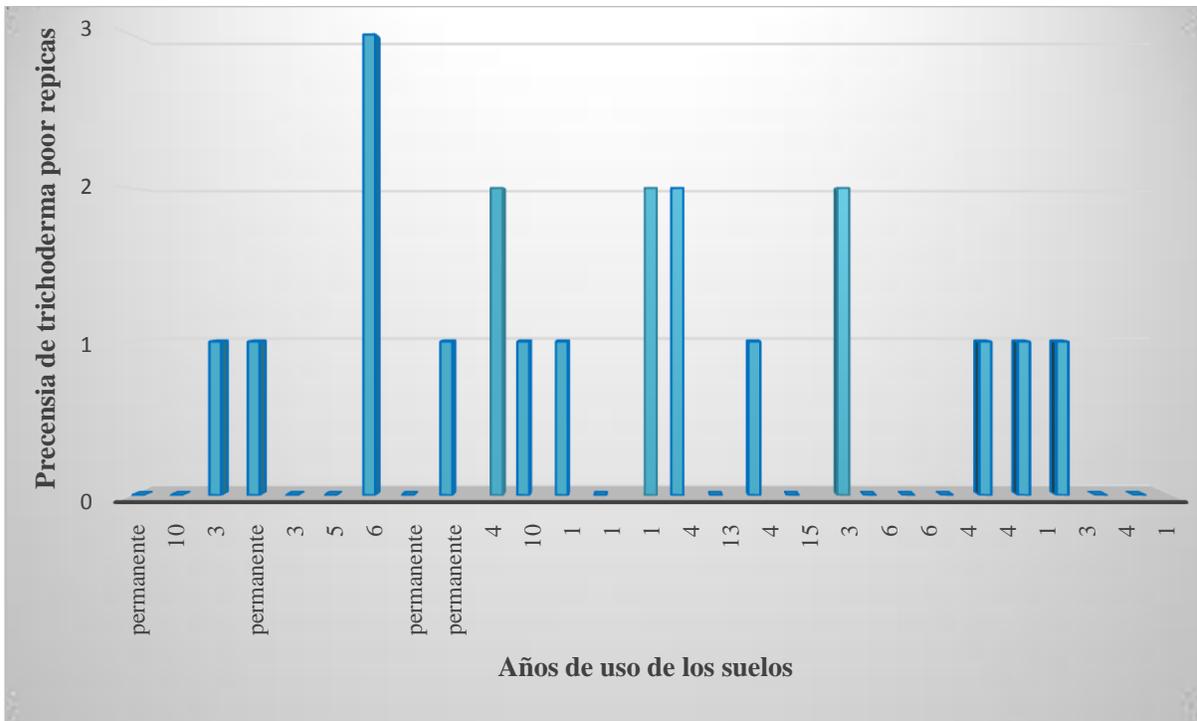


Grafico N0. 4Comportamiento de la presencia del hongo *Trichoderma sp* por años de usos de los suelos en la empresa Pantaleón. Junio y agosto del 2017.

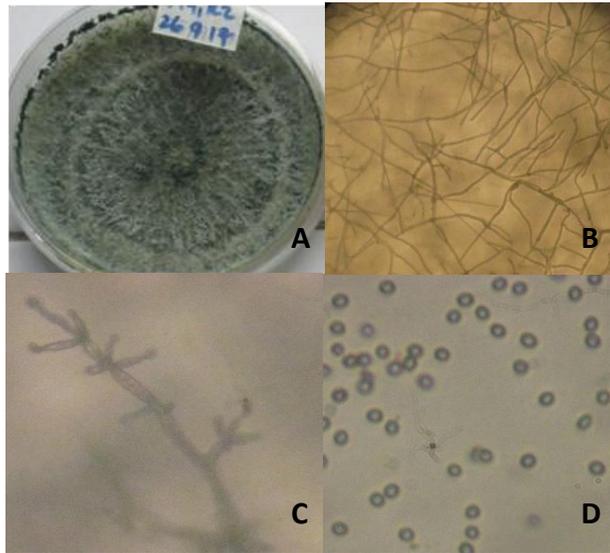
El grafico N° 4, muestra el comportamiento del hongo *Trichoderma* de acuerdo a los años de usos, en la cual en la muestra N° 7 que tiene 6 años de tener establecido la especie arbórea de Roble, tiene la mayor presencia de *Trichoderma* en sus tres replicas, seguidas de las muestras 10, 14, 15y 19 que se tienen establecido caña (4 años), caña (1 año), caña (4 años)y maíz (3años) respectivamente, en la cual presentan presencia de *Trichoderma* en 2 de sus réplicas.

6.2 Caracterización de las especies de *Trichoderma* encontradas en las muestras de suelo de la empresa Pantaleón junio y agosto del 2017.

Tabla No.2 Especies de *Trichoderma* encontradas por muestra y cultivo en suelos de la empresa Pantaleón. Junio y agosto del 2017.

CULTIVO	ESPECIE ENCONTRADA
Bosque	0
Caña	0
Maíz	<i>T. koningii</i>
Bosque	<i>T. sp.</i>
Bosque	0
Teca	0
Roble	<i>T. harzianum, T. koningii</i>
Eucalipto	0
Bambú	<i>T. inhamatum</i>
Caña	<i>T. inhamatum, T. koningii</i>
Maní	<i>T. inhamatum</i>
Caña	<i>T. koningii</i>
Cacao + Musáceas	0
Caña	<i>T. koningii</i>
Caña	<i>T. koningii</i>
Caña	0
Caña	<i>T. viride</i>
Caña	0
Maíz	<i>T. inhamatum, T. koningii</i>
Caña	0
Caña	0
Caña	0
Caña	<i>T. harzianum</i>
Suelo quemado	<i>T. koningii</i>
Suelo quemado	<i>T. harzianum</i>
Suelo quemado	0
Suelo quemado	0

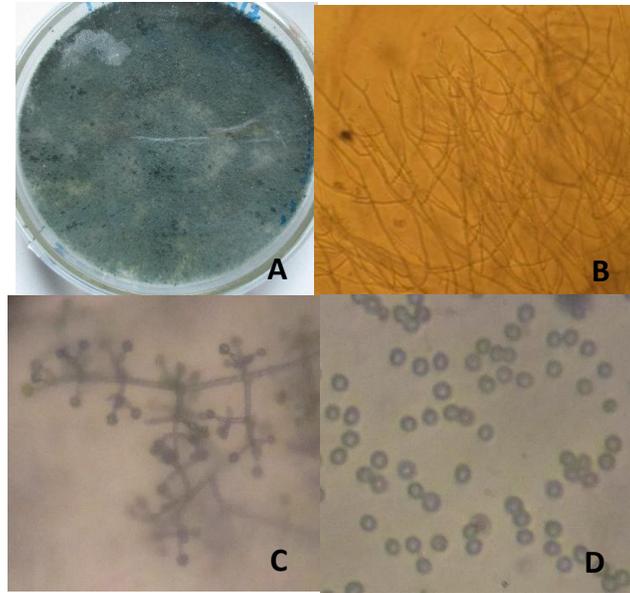
En la tabla No 2, se observan los cultivos establecidos en las áreas de donde se colectaron las muestras estudiadas y las especies de *Trichoderma* que fueron aisladas y caracterizadas, encontrando 5 especies de *Trichoderma* siendo estas en su mayoría encontradas en los cultivos de caña y maíz, otras encontradas en suelos que fueron quemados previo para la extracción de la caña y en áreas donde se encuentra establecido arboles forestales (Roble), en las otras dos áreas con suelos quemados que ya no tenían el cultivo de caña no se encontró presencia de *Trichoderma* donde no



Imágen 1: *Trichoderma koningii* (A) crecimiento de colonia en PDA, (B) crecimiento de conidioforo, (C) formación de filiales, (D) conidias.

En la imágen N° 1, en el inciso (A) se observa en el crecimiento de las colonias de forma circular e irregular, con un aspecto un poco algodónoso, de color verde oscuro, de textura polvorienta, con una especie como de hilo de color blanco que inician desde el centro del plato hasta el borde. En el inciso (B) se observa el crecimiento de los conidioforos, son rectos y de forma ceptada. En el inciso (C) se muestra la formación de los filiales, un poco infladas en la base que esta unidas al conidioforo, pero chatas en las puntas, en la cual se inicia la formación de las conidias individuales. En el inciso (D) se observan las conidias redondas y brillantes.

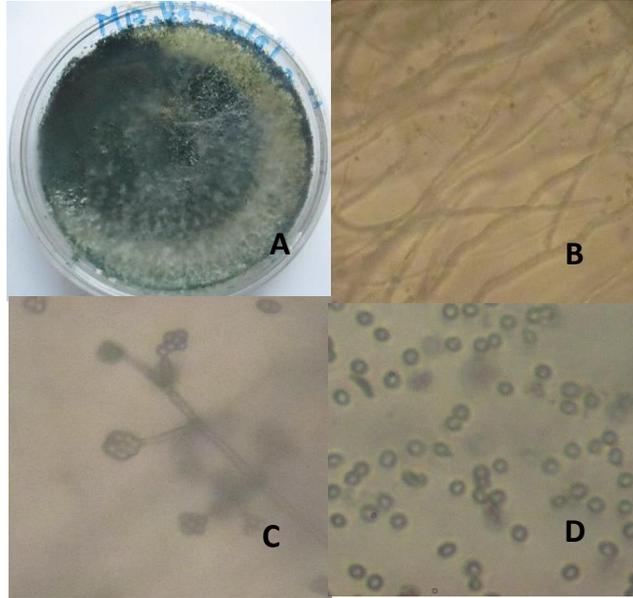
Según las características descritas anteriormente, comparadas con las características de crecimiento de las colonias, conidioforos, filiales y la formación de conidias que define Rifai, 1969, citadas por Cruz, 2007 se logro definir a esta especie de hongo como *Trichoderma koningii*.



Imágen 2: *Trichoderma harzianum*. (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, (B) Crecimiento de conidioforo, (C) filiales, (D) conidias.

En estas imágenes en el inciso (A) se observa el crecimiento de las colonias en plato petri, cubriendo totalmente el plato, el cual presenta un color verde oscuro. En el inciso (B) observamos el crecimiento de los conidióforos, son rectos, ramificados. En el inciso (C) se muestra la formación de las filiales, que tienen una forma como de botella, es un poco achatada en las puntas e hinchadas en la parte central y por último en el inciso (D) observamos las conidias que son redondas, y color verde brillantes.

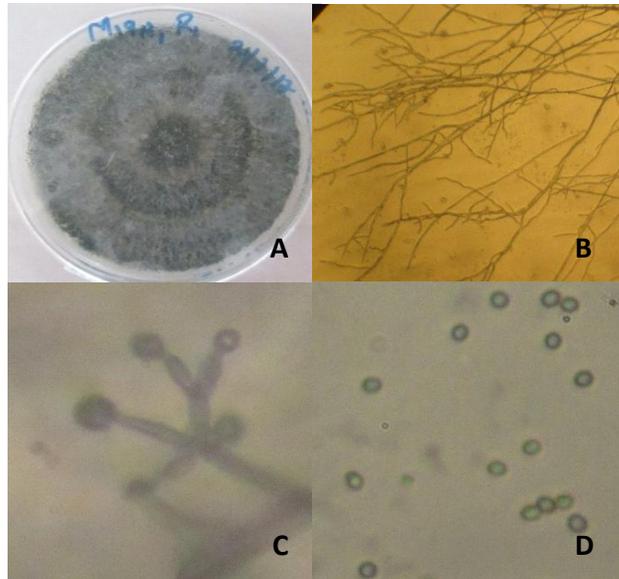
Con todas las características descritas anteriormente y comparadas con las características que define Rifai, 1969, citadas por Infante, 2009, nos define a esta especie de *Trichoderma* como *harzianum*.



Imágen 3: *Trichoderma viride*, (A) colonia en PDA, (B) crecimiento de conidióforo, (C) inicio de la formación de filiades, (D) conidias.

En la imágen N° 3, observamos en el inciso (A) el crecimiento de las colonias en el plato petri, que presenta una textura algodonosa, de color blanco-verdoso, con una especie de hilos que van desde el centro del plato hasta las orillas, en el centro del plato inicia una formación de un círculo irregular de color verde, seguido de un espacio con un verde menos intenso, luego la formación de otro círculo de color verde, hasta completar el plato. En el inciso (B) se muestra las formaciones de conidióforo, rectos, ramificados y en el inciso (C) se observa la formación de las fiálides, únicas, y de forma cilíndrica, también se logra ver claramente los conidios agrupados, y por último en el inciso (D) se muestran las conidias individual, de forma circular, de color verde brillante.

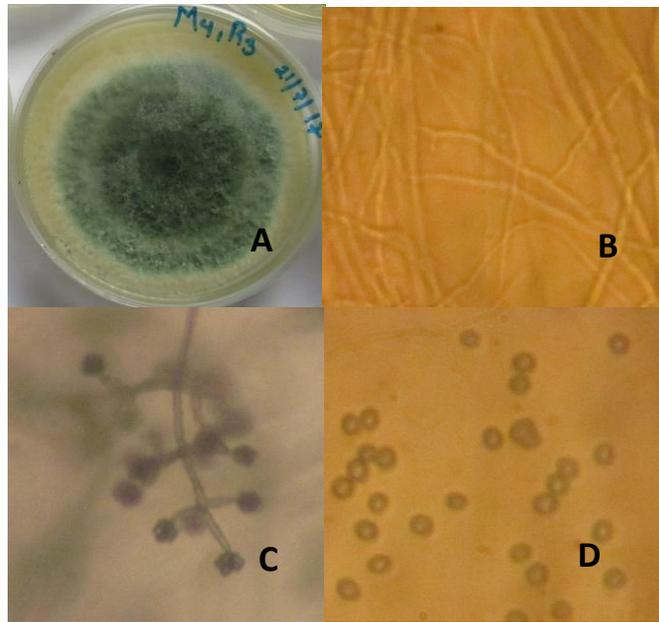
Con todas las características descritas anteriormente, y comparadas con las características que describió Persoon en 1974, citadas por Vásquez, 2010, se llegó a la conclusión de definir a esta especie como *Trichoderma viride*.



Imágen 4: *Trichoderma inhamatum*, (A) crecimiento de colonia en PDA, (B) conidioforo, (C) fialides, (D) conidias

En la imágen N° 4, en el inciso (A) se observa el crecimiento de las colonias en el plato petri, presenta textura algodonosa, de color verde olivo, desde el centro del plato se observa crecen unos hilos de color blanco que terminan en el borde del mismo, el crecimiento de la colonia inicia con un halo de color verde, seguido de un espacio con la apariencia de un anillo de un color blanquesino, seguido de otro halo de color verde y así sucesivamente hasta completar todo el plato. En el inciso (B) se observa el crecimiento del conidióforo, rectos, ramificados. En el inciso (C) se observa la formación de fialides septadas y que están dispuestas en forma de racimos en la cual producen las conidias en su extremo. Y por último en el inciso (d) se observan las conidias, de forma circular y color verde brillante.

Se logró definir esta especie como *Trichoderma inhamatum* después de haber estudiado, analizado y compararon características que describe García, *et al.*, 2016 en su investigación.



Imágen 5: *Trichoderma* sp., (A) crecimiento de colonia en PDA, (B) conidioforo, (C) fialides, (D) conidias.

En la imagen N° 5, observamos el crecimiento de las colonias en el plato petri, en la cual se observa la formación de círculos irregulares, con textura algodonosa, de color verde tierno y una especie de hilos blanquecinos, en el inciso (B) se muestra la formación de conidióforo, rectos, en el inciso (C) se observa la formación de micelios, ramificados en forma de un pequeño arbolito, achatadas en los ápices, un poco hinchadas en la parte central y los conidios agrupados, y por último en el inciso (D) se muestran las conidias, con forma circular, de color verde brillante.

Con todas las características descritas anteriormente, y comparadas con las características que describió Barnett & Hunter 1972, citados por Chávez, 2006, se llegó a la conclusión de definir a esta especie como *Trichoderma* sp.

VII. CONCLUSIONES

se caracterizaron e identificaron 5 especies de *Trichoderma* encontradas en 14 muestras que representan un 48% de presencia. Las especies encontradas fueron, *T. koningii*, *T. harzianum*, *T. viride*, *T. inhamatum*, y *T. sp*, siendo todas estas nativas de las zonas, es decir que fueron extraídas de suelos en los que nunca se ha realizado la aplicación de ninguna especie de *Trichoderma*, estas especies se diferenciaron de acuerdo a sus características macroscópicas su crecimiento en el plato con medio de crecimiento (PDA) Y y sus características microscópicas en especial en la formación de las fialides en donde *T. koningii* tiene crecimiento de fialides un poco infladas en la base pero chatas en las puntas donde inicia la formación de conidias individuales, *T. harzianum* con fialides que son achatadas en las base y las puntas e hinchadas en la parte central con formación de conidias agrupadas, *T. viride* con fialides de forma cilíndrica, únicas y formación de conidias agrupadas, *T. inhamatum* con fialides septadas en forma de racimos produciendo conidias individuales en sus puntas y *T. sp* fialides en formación de fialides ramificados en forma de pequeños arbolitos, achatadas en las base y la punta, pero hinchadas en la parte central y presentan la formación de conidias agrupadas.

VIII. RECOMENDACIONES

- Trabajar en condiciones de temperatura del laboratorio adecuada (27°C), en una area totalmente hermetica y libre de contaminantes.
- Las muestra que ya han sido identificas preservarlas para evitar contaminacion cruzada o de plato a plato.
- Para conservar y aumentar la presencia de las especies de hongo encontradas hay que realizar metodos de conservacion de suelo (no dejar el suelo desprotegido para asi poder aumentar el contenido de materia organica en el suelo, evitar el excesivo uso de productos quimicos, etc.)
- Realizar un estudio sobre la capacidad antagnica de cada una de las especies de *Trichoderma* encontradas en la zona frente a enfermedades.
- Evaluar la productivida del cultivo despúes de la aplicación de las especies *Trichoderma*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, Sivila. 2013. Producción artesanal de *Trichoderma*. Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar. En línea. Consultado el 19 de mayo 2017. Disponible en: <http://www.cedaf.fca.unju.edu.ar/assets/manual-de-trichoderma-2013---sivila-alvarez.pdf>
- Ames, Cañedo. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. PDF. En línea. Consultado el 24 de agosto 2017. Disponible en: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Biocultivos S.A. Ficha técnica. *Trichoderma viride*. Disponible en: <http://www.biocultivos.com.co/dctos/Ficha+Tecnica+Cientifica+del+Trifisol.pdf>
- Chávez. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). (En línea). Bogotá. D.C. 2006. Consultado 25 abril 2016. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>
- Cholango. 2009. Selección de cepas de *Trichoderma* sp. In vitro para el control de problemas radiculares en flores de verano. PDF. En línea. Consultado el 23 de enero 2017. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2599/1/T-ESPE-IASA%20I-004154.pdf>
- Cruz, 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. En línea. Consultado el 19 mayo 2017. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>
- Cubillos, C., Ramírez, M., et al. 2014. Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del Centro de Formación Agroindustrial La Angostura de Campoalegre (Huila). En línea. Colombia. Consultado 19 de mayo 2016. Disponible en: <http://www.sena.metarevistas.org/index.php/raaa/article/download/145/166>
- Producción y uso de hongos entomopatógenos. PDF. En línea. Consultado el 18 mayo 2017. Disponible en: <file:///C:/Users/ADMIN/Downloads/Produccion%20y%20uso%20hongos.pdf>

- García. et al., 2016. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. En línea. Consultado 22 de noviembre 2017. Disponible en http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942016000100004

- Guzmán, 2010. Manual técnico para la producción de *Trichoderma sp.*, como fungicida biológico en la sociedad cooperativa “Equipo de composteo de Atlixco” Ecomatlix s.c. de R.L. de C.V., en Atlixco, Puebla. En línea. Consultado el 25 de noviembre 2017. Disponible en <https://es.slideshare.net/tobystone1983/2-manual-tecnicotrichoderma>.

- Hernández, et al., 2011. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma sp* nativos del noreste de México. En línea. Consultado el 23 de noviembre 2017. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/28009/28259>

- Infante, Danay, Martínez, B Y González, Noyma., 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. Vol. 24. No. 1. 2009. En línea. Consultado el 22 de noviembre 2017. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002

- Infojardin, 2007. Todo sobre *Trichoderma*. (En línea). Consultado 25 abril 2016. Disponible en: <http://archivo.infojardin.com/tema/hongo-trichoderma-articulo.39804/>

- Martínez, Infante y Reyes, 2013. *Trichoderma sp.* Y su función en el control de plagas en los cultivos (En línea) Scielo . La Habana, Cuba. Consultado 23 de mayo 2016. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001.

- Méndez, Reyes. 2009. Evaluación de *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico de enfermedades fungosas de suelo en el vivero de aclimatación de café clonado en la finca La Cumplida, San Ramón, Matagalpa. Tesis. Consultado en 22 de noviembre 2017.

- Michel, 2001. Cepas nativas de *Trichoderma sp* (Eufungi: hyphales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *fusarium subglutinans* y *f. oxysporum* (Eufungi: hyphales). (En línea). Colima, México, 2001. Consultado 25 abril 2016. Disponible en:

http://digeset.ucoj.mx/tesis_posgrado/Pdf/Alejandro%20Casimiro%20Michel%20Aceves.PDF

- Sánchez, v., Hernández, F. 2009. Aislamiento y caracterización de *Trichoderma* sp. de diferentes ecosistemas en la región de Papaloapan. (En línea). Oaxaca, México. Consultado 19 de mayo 2016. Disponible en: http://www.unpa.edu.mx/investigacion/Proyecto_Promep_UNPA.pdf
- Tovar. 2008. Evaluación de la capacidad antagonista “ in vivo” de aislamiento de *Trichoderma* sp frente al hongo fitopatógenos *Rhizoctonia solani*. PDF. En línea. Consultado el 19 de mayo 2017. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>
- *TrichoMan Trichoderma resources of Manipur*. En línea. Consultado 24 agosto 2017. <http://14.139.223.245/tricho/searchResult.php>.
- *Trichoderma koningii*. En línea. Consultado 17 septiembre 2017 https://en.wikipedia.org/wiki/Trichoderma_koningii
- Vásquez, 2010. Caracterización microbiológica y producción de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en cultivo artesanal. En línea. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8662/tesis615.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

ANEXOS.

En las imágenes que se observan a continuación se muestra el paso a paso de la producción de *Trichoderma*.



Fig. 1: Muestras de suelos colectadas en los suelos agrícolas del Ingenio Monte Rosa



Fig. 2: Lavado, secado y sellado de los platos petric con papelgrafo y colocados en bolsas plasticas para su posterior esterilizacion en la autoclave (olla de presion).



Fig. 3: Esterilizacion de tubos de ensayo con 10ml de agua



Fig. 4: Preparacion de infucion de papa y elaboracion del PDA(Infucion de papa 1lt, Amoxicilina 1000mg, Agar 20g y Dextrosa 20g)



Fig. 5: Pesaje de 1 gr se suelo para preparar la soluion madre.

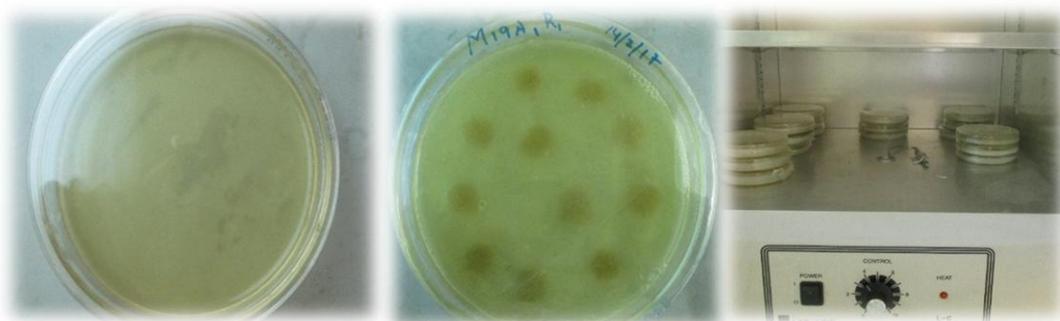


Fig. 6: Colocacion de la soluion madre en el PDA y su posterior encubacion.