

ARTICLE / INVESTIGACIÓN

Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Trichoderma* en la provincia de Tungurahua, Ecuador

Isolation and characterization of native strains of *Trichoderma* in Tungurahua province, Ecuador

Leiva-Mora Michel^{1*}, Natalys Solís², Alfredo Jiménez González³ and David Anibal Guerrero Cando²

DOI. 10.21931/RB/2023.08.03.5

¹Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.³Facultad de Ciencias Naturales y de la Agricultura, Carrera de Ingeniería Forestal, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Ecuador.Corresponding author: m.leiva@uta.edu.ec.

Resumen: El presente trabajo tuvo como objetivo aislar y caracterizar cepas de *Trichoderma* de la provincia de Tungurahua en Ecuador. Se usaron cuatro métodos de aislamiento, siendo el método de diluciones seriadas a partir de muestras de suelo donde mayor cantidad de aislados de *Trichoderma* se obtuvo. El diámetro de las hifas, diámetro de conidios y longitud de fiálides fueron muy similares entre los cuatro aislados y concuerdan con los informados para este género. Los conidióforos fueron ramificados, apariencia seca, forma de elipsoidal a esférica. Las paredes de los conidios fueron lisas, incoloros a verdes. Las fiálides en forma de botellas se observaron en todos los aislados.

Palabras clave: Conidio, colonia, fiálide, hongos, morfología.

Abstract: The present work aimed to isolate and characterize native strains of *Trichoderma* from Tungurahua, Ecuador. Four methods were used for isolation, the serial dilutions from soil samples being the one that allowed the most significant amount of *Trichoderma* isolates to be obtained. The diameter of the hyphae, the diameter of the conidia, and the length of the phialides were very similar among the four *Trichoderma* isolates. The conidiophores were branched with a dry appearance, ellipsoidal to spherical shape. The walls of the conidia were smooth. The conidia were colorless to green. Bottle-shaped phialides were observed in all isolates.

Key words: Conidia, colony, fungi, morphology, phialide.

Introducción

Trichoderma es un hongo filamentoso de la clase ascomicete, habitante del suelo donde produce numerosos conidios unicelulares¹. En los suelos existe una gran diversidad de especies de este género, motivo por el cual muchos aislamientos se realizan a partir de este recurso natural². Varias especies de *Trichoderma* aisladas a partir de muestras de suelo tienen aplicaciones en la industria y particularmente en la agricultura³. Desde el punto de vista bioecológico las especies de *Trichoderma* colonizan a diferentes especies de plantas de interés agrícola y en muchos casos ofrecen efecto protector contra enfermedades⁴.

Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos mediante la producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que provocan daños estructurales de la pared celular, vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular de los hongos fitopatógenos que controlan⁵. En numerosos cultivos el uso de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* ha permitido disminuir entre 10 y 13% de incidencia de hongos fitopatógenos del suelo en comparación con la no aplicación de los mismos⁶.

Varios estudios relacionados con el bicontrol de agentes fitopatógenos del suelo han cifrado sus esperanzas en el uso de cepas nativas recuperadas del suelo⁷, la rizósfe-

ra⁸ e incluso de la endosfera de las raíces de plantas de interés económico⁹. En el cultivo de cebolla igualmente para el control de la pudrición blanca de la cebolla se han realizado esfuerzos por aislar cepas de *Trichoderma* con capacidad bicontroladora¹⁰.

En el cultivo de cebolla en Ecuador la pudrición blanca causada por *Stromatinia cepivora* (Berk.) Whetzel causa severos daños a los productores de la provincia de Tungurahua. El presente trabajo tuvo como objetivo principal aislar mediante cuatro métodos y caracterizar cultural y morfológicamente cepas nativas de *Trichoderma* en la provincia de Tungurahua, Ecuador.

Materiales y métodos

Método 1. Inclusión de raíces a partir de plantas sanas

De condiciones de campo se tomaron raíces de plantas sanas que se encontraban cercanas a plantas enfermas. En condiciones de laboratorio se lavaron en agua corriente durante 10 minutos, posteriormente fueron desinfectadas en hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 minutos. Luego fueron lavadas 2 veces en agua desionizada estéril. Pos-

Citation: Mora Michel L, Solís N, Jiménez González A, Guerrero Cando D A. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Trichoderma* en la provincia de Tungurahua, Ecuador. *Revis Bionatura* 2023;8 (3) 5. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2023.08.03.5>

Received: 28 May 2023 / **Accepted:** 15 July 2023 / **Published:** 15 September 2023

Publisher's Note: Bionatura stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



teriormente en condiciones de flujo laminar en un plato metálico de 20 cm de diámetro se seccionaron las raíces con la ayuda de un bisturí estéril en fragmentos de 5 mm. Finalmente dichos fragmentos fueron incluidos mediante aguja de inoculación en el medio de cultivo Agar Rosa Bengala.

Método 2. Cebo utilizando fragmentos de coco

Se tomaron frutos secos de *Cocus nucifera* L. de la variedad gigante. Los frutos fueron cortados por la mitad y fueron colocados a 5 cm de profundidad en condiciones de campo. Se dejaron durante 21 días y posteriormente fueron colectados y trasladados hacia el laboratorio en una nevera de Pilietilurano que contenía bolsas de hielo. En el laboratorio se colocaron en una bandeja metálica de 5 L y de las porciones con crecimiento verde se tomaron fragmentos de micelio y se transfirieron mediante aguja de inoculación a cajas de Petri que contenían 25 mL del medio de cultivo Agar Rosa Bengala y se incubaron a 25°C.

Método 3. Cebo preparado a partir de arroz cocinado con melaza y harina de pescado

Se colocó 250 g de arroz cocinado sin sal, dos cucharadas de melaza y dos cucharadas de harina de pescado y se cocieron durante 20 minutos. Posteriormente se colocaron 100 g de esta mezcla en el fondo de un recipiente plástico de 500 mL de capacidad y se le colocó como cubierta una Malla de criba fina de plástico (HDPE) extruido de alta calidad de 120 Mesh. Los recipientes fueron colocados en hoyos de 20 cm de profundidad en el suelo.

Método 4. Método de diluciones seriadas a partir de muestras de suelo.

Se pesaron 10 gramos de muestra de suelo en una bolsa de Stomacher, previamente etiquetada, y se mezclaron con 90 mL de agua de triptona al 0,1%. Y se homogeneizó durante 1 a 3 minutos. A partir de la dilución inicial, se prepararon diluciones decimales seriadas, tomando 1 mL de la dilución 10-1 y descargándolo en 9 mL de agua de triptona al 0,1% y así, sucesivamente hasta llegar a la dilución de 10-5. Cada dilución en tubos de ensayo se sometió a una agitación vigorosa mediante un agitador mecánico tipo Vortex.

El contenido de los tubos de ensayo correspondientes a las diluciones a partir de las diluciones de 10-3, 10-4 y 10-5 fue vertido en cajas de Petri que contenían 25 ml del medio de cultivo Agar Rosa Bengala con Cloranfenicol. Posteriormente el exceso de líquido de las cajas de Petri fue decantado y las cajas de Petri se colocaron en incubadora durante 7 días a 25°C. Las colonias con aspectos culturales similares a *Trichoderma* fueron transferidas a nuevas cajas de Petri que contenían 25 ml del medio de

cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) e incubadas durante 7 días a 25°C.

Para la caracterización morfológica de los aislados se tomaron en cuenta los criterios referidos por Siddiquee (2017)¹¹.

Resultados y discusión

Método 1. Inclusión de raíces a partir de plantas sanas

Con el método de inclusión de raíces en el medio de cultivo Agar Rosa Bengala no se pudo recuperar de las muestras analizadas cepas de *Trichoderma*. Los géneros de hongos que más prevalecieron con este método fueron *Fusarium* y *Penicillium* (figura 1). Estos resultados no coinciden con los informados por Abdelrahman et al., 12 quienes lograron obtener aislados de *Trichoderma longibrachiatum* a partir de fragmentos de raíces de cebolla sanas, los cuales mostraron actividad antifúngica in vitro frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. cepa.

Método 2. Cebo utilizando fragmentos de coco

Al cabo de los 14 días se observaron numerosas colonias con crecimiento filamentososo y coloraciones que variaron desde el verde claro, verde oscuro, blanco al gris. Cuando se realizaron análisis bajo el microscopio prevaleció el género *Penicillium* pero no se logró obtener colonias del género *Trichoderma* (figura 2). En relación con la selectividad del coco para la captura de especies de *Penicillium* sp. nuestros resultados son similares a los obtenidos por Cortés-Rivera¹³.

Método 3. Cebo preparado a partir de arroz cocinado con melaza y harina de pescado

Mediante el uso de tarrinas con sustrato de arroz, melaza y harina de pescado se comenzaron a observar la formación de colonias verdes, amarillas y blancas a partir de los 7-10 días. Con el presente método solo se obtuvo un aislado de *Trichoderma* (P5M1) pues la mayor parte de las tarrinas poseían colonias de *Penicillium* y *Aspergillus* que impidieron obtener aislados puros de *Trichoderma* (figura 2).

Método 4. Método de diluciones seriadas a partir de muestras de suelo

Con este método se obtuvieron 3 aislados (P10M2, P4M2 y P6M3) de *Trichoderma* (figura 3).

Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por Cubillos et al. (2014) quienes a partir de sustratos enriquecidos con arroz pudieron aislar exitosamente cepas de



Figura 1. Colonias de hongos filamentosos de los géneros *Fusarium* y *Penicillium* obtenidas mediante el método de inclusión de raíces en medio de cultivo Agar Rosa Bengala a partir de plantas sanas de cebolla.



Figura 2. Presencia de colonias de hongos filamentosos en tarrinas a los 10 días de colocadas en campo. Aislado de *Trichoderma* (P5M1) obtenido a partir de colonia de color verde oscuro.



Figura 3. Colonias de aislados de *Trichoderma* (P10M2, P4M2 y P6M3) obtenidos mediante método de diluciones seriadas a partir de muestras de suelo y crecidas en el medio de cultivo PDA durante 10 días a 25°C.

*Trichoderma*¹⁴. Asimismo, en algunas cajas de Petri aparecieron otros hongos del género *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (figura 4).

Caracterización morfológica de los aislados obtenidos de *Trichoderma*

En relación con los valores de las variables diámetro de las hifas, diámetro de conidios y longitud de fiálides fueron muy similares entre los cuatro aislados de *Trichoderma*. Los conidióforos fueron ramificados. Las ramas principales de los conidióforos producen ramas laterales que pueden estar emparejadas o no, las ramas más largas distantes del extremo las fiálides surgieron directamente del eje principal cerca del extremo. Algunas ramas secundarias cerca del eje principal. Todas las ramas primarias y secundarias surgieron en un ángulo de 90° aproximadamente con respecto al eje principal. El conidióforo típico de *Trichoderma* forma

ramas apareadas con un aspecto piramidal. Normalmente, los conidióforos terminaron en uno o unos pocas fiálides (figura 5).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Zhang et al., (2022) quienes refirieron la presencia de conidióforos ramificados irregularmente con estructura dendriforme los cuales terminaban en verticilos cruzados con varias fiálides¹⁵.

Los diámetros promedios de las hifas para los aislados fueron: 7,30 μm (P10M2), 7,60 μm (P4M2), 7,28 μm (P5M1) y 7,00 μm (P6M3). Los diámetros promedios de los conidios fueron: 2,90 μm (P10M2), 3,17 μm (P4M2), 2,90 μm (P5M1) y 3,46 μm (P6M3). Finalmente, la longitud promedio de las fiálides fueron: 14,70 μm (P10M2), 15,68 μm (P4M2), 14,50 μm (P5M1) y 13,28 μm (P6M3) (tabla 1). Estos promedios tanto en el diámetro de hifa como de los conidios fueron similares a lo informado por Cuervo-Parra et (2022)¹⁶.

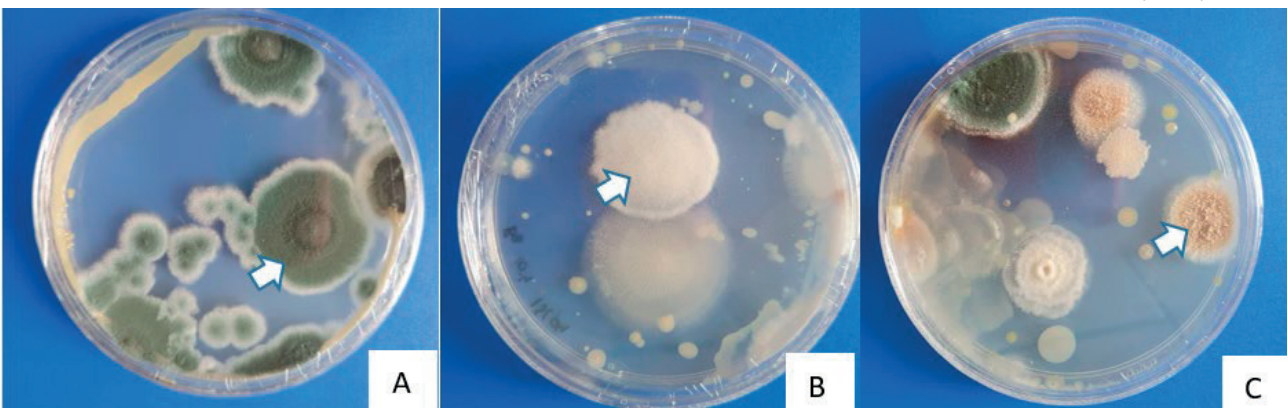


Figura 4. Otros géneros de hongos que aparecieron en cajas de Petri utilizando el método de aislamiento directo. Colonia de *Penicillium* (A), Colonia de *Fusarium* (B) y Colonias de *Aspergillus* (C).

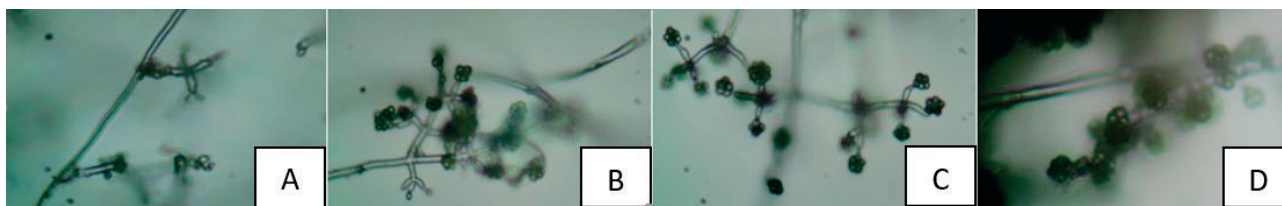


Figura 5. Características de conidióforos, fiálides y conidios de los aislados de *Trichoderma* obtenidos. A- Aislado P10M2. B- Aislado P4M2. C- Aislado P5M1. D- Aislado P6M3.

Aislados	Diámetro de las hifas (μm)	Diámetro de conidios (μm)	Longitud de fiálides (μm)
P10M2	7,30	2,90	14,70
P4M2	7,60	3,17	15,68
P5M1	7,28	2,90	14,50
P6M3	7,00	3,46	13,28

Tabla 1 Caracterización morfológica de los aislados obtenidos de *Trichoderma*.

En relación con los conidios en los cuatro aislados de *Trichoderma* estos mostraron apariencia seca, forma de elipsoidal a esférica, de 3 a 5 x 2 a 4 μm de largo de modo general, aunque cada aislado mostraron dimensiones específicas. Los conidios en sus paredes mostraron superficies lisas. Se observaron conidios incoloros a verdes. Las fiálides en forma de botella, con aspectos de cilíndricas o casi subglobosas, sostenidas en espirales e insertadas en un ángulo de 90°. Respecto a la forma de los conidios estos fueron similares a los descritos por Kamil et al., (2022) aunque los de estos autores prevalecieron las formas elipsoidales¹⁷.

Conclusiones

Con el método de diluciones seriadas a partir de muestras de suelo de la provincia Tungurahua, se lograron aislar con mayor eficiencia cepas nativas del suelo de *Trichoderma*. Acorde con el diámetro de las hifas, diámetro de conidios y longitud de fiálides observadas, sus características morfológicas fueron similares al género *Trichoderma*.

Contribuciones de los autores

Conceptualización, Michel Leiva Mora y Alfredo Jimenez González; Metodología, Michel Leiva Mora, Yosbel Lazo Roger y Gustavo Daniel Valle Naranjo; software, Michel Leiva Mora y Gustavo Daniel Valle Naranjo, validación, Michel Leiva Mora y Yosbel Lazo Roger, análisis formal, Michel Leiva Mora y Alfredo Jimenez González; investigación, Michel Leiva Mora y Gustavo Daniel Valle Naranjo; recursos, Alfredo Jimenez González y Michel Leiva Mora, curado de datos, Yosbel Lazo Roger, Michel Leiva Mora; redacción—redacción borrador original, Michel Leiva Mora, Gustavo Daniel Valle Naranjo, Yosbel Lazo Roger; redacción—revisión y edición, Yosbel Lazo Roger, Michel Leiva Mora, Gustavo Daniel Valle Naranjo y Alfredo Jimenez González; supervisión, Michel Leiva Mora; administración del proyecto, Michel Leiva Mora, adquisición del financiamiento, Alfredo Jimenez González y Michel Leiva Mora; Todos

los autores han leído y están de acuerdo con la versión publicada del manuscrito.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE) de La Universidad Técnica de Ambato por el financiamiento otorgado al proyecto de investigación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Selección de aislados de *Trichoderma* spp. con potencial biocontrolador del agente causal de la pudrición blanca de la cebolla con Resolución Nro. UTA-CONIN-2020-0312-R mediante el cual fue posible el desarrollo del presente trabajo.

Conflictos de Interés

Los autores manifestamos que no existen conflicto de intereses ni argumentos que invaliden la publicación del manuscrito.

Referencias bibliográficas

- Elkhateeb WA, Elnahas MO, Daba GM, Zohri ANA. Biotechnology and Environmental applications of *Trichoderma* spp. *Res J Pharmacogn Phytochem*. 2021;13(3):149-157.
- Du Plessis IL, Druzhinina IS, Atanasova L, Yarden O, Jacobs K. The diversity of *Trichoderma* species from soil in South Africa, with five new additions. *Mycologia*. 2018;110(3):559-583.
- Poveda J. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. *Biol Control*. 2021;159:104-634.
- Alfiky A, Weisskopf L. Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *J Fungi*. 2021;7(1):61.
- Mukhopadhyay R, Kumar D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egypt J Biol Pest Control*. 2020;30(1):1-8.
- Marques E, Martins I, Mello SCMD. Antifungal potential of crude extracts of *Trichoderma* spp. *Biota Neotrop*. 2018;18.
- Ferreira FV, Musumeci MA. *Trichoderma* as biological control agent: Scope and prospects to improve efficacy. *World J Microbiol Biotechnol*. 2021;37(5):1-17.

8. Rivera-Méndez W, Brenes-Madriz J, Alvarado-Marchena L. Effect of *Setophoma terrestris*, *Sclerotium cepivorum*, and *Trichoderma* spp. on in vitro onion (*Allium cepa*) root tissues and the final yield at the field. *Eur J Plant Pathol.* 2021;160(1):53-65.
9. Rivera-Mendez W, Obregon M, Moran-Diez ME, Hermosa R, Monte E. *Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions. *Biol Control.* 2020;141:104-145.
10. Siddiquee S. *Practical handbook of the biology and molecular diversity of Trichoderma species from tropical regions.* Cham: Springer International Publishing; 2017.
11. Abdelrahman M, Abdel-Motaal F, El-Sayed M, Jogaiah S, Shigyo M, Ito SI, Tran LSP. Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa* by target metabolite profiling. *Plant Sci.* 2016;246:128-138.
12. Cortés-Rivera HJ, Blancas-Benitez FJ, Del Carmen Romero-Islas L, Gutiérrez-Martínez P, González-Estrada RR. In vitro evaluation of residues of coconut (*Cocos nucifera* L.) aqueous extracts, against the fungus *Penicillium italicum*. *Emirates J Food Agric.* 2019;613-617.
13. Cubillos CÁ, Ramírez MG, Toledo RL. Aislamiento de *Trichoderma* sp., en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial la angostura de campo alegre (Huila). *Rev Agropecu Agroind La Angostura.* 2014;1(1):15-20.
14. Zhang GZ, Yang HT, Zhang XJ, Zhou FY, Wu XQ, Xie XY, et al. Five new species of *Trichoderma* from moist soils in China. *MycKeys.* 2022;87:133.
15. Cuervo-Parra JA, Pérez España VH, Zavala-González EA, Peralta-Gil M, Aparicio Burgos JE, Romero-Cortés T. *Trichoderma Asperellum* strains as potential biological control agents against *Fusarium verticillioides* and *Ustilago maydis* in maize. *Biocontrol Sci Technol.* 2022;32(5):624-647.
16. Kamil D, Prameela Devi T, Choudhary SP, Das A, Kumar A. Genome-Mediated Methods to Unravel the Native Biogeographical Diversity and Biosynthetic Potential of for Plant Health. In: *Fungal diversity, ecology and control management.* Singapore: Springer; 2022. p. 109-124.
17. Sudantha IM, Suwardji S. Biodiversity of *Trichoderma* antagonist saprophytic fungi and its use for bio-control of *Fusarium* wilt disease on shallots at Lombok Island, West Nusa Tenggara, Indonesia. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2021;886(1):012123.