



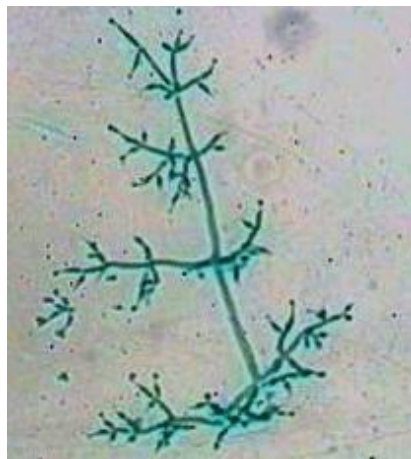
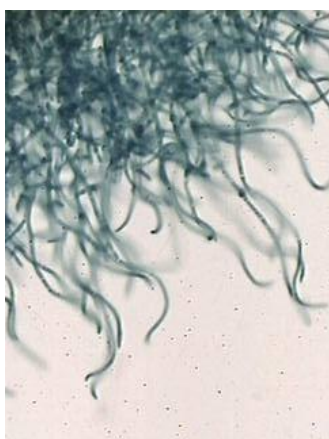
PERÚ

Ministerio  
de Agricultura

Servicio Nacional  
de Sanidad Agraria  
SENASA

Dirección  
de Sanidad Vegetal

*“Decenio de las Personas con Discapacidad en el Perú”  
“Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de  
Nuestra Diversidad”*



## MANUAL DE PRODUCCIÓN Y USO DE HONGOS ANTAGONISTAS



**Ing. Hilda Gómez Ramírez  
Ing. Whilly Soberanis Ramírez  
Blg. Martín Tenorio Cantoral  
Blg. Enrique Torres Del Aguila**

**2013**

## CONTENIDO

	Páginas
INTRODUCCIÓN	5
HONGOS ANTAGONISTAS	6
<i>Trichoderma</i> spp.	6
Mecanismos de acción de los hongos antagonistas	
Antibiosis	7
Competencia	7
Parasitismo	7
Inducción de resistencia	7
Cómo actúan	8
PRODUCCIÓN DE HONGOS ANTAGONISTAS	8
PRODUCCIÓN SEMI INDUSTRIAL	9
Aislamiento de hongos antagonistas	9
Recolección de muestras	9
Procesamiento de muestras	9
Aislamiento	9
De hojas	9
De raíces	9
De frutos	9
De suelo	9
Cultivos monoespóricos	10
Conservación del cepario	11
Cepario de conservación	11
Cepario de producción	11
Cultivos puros	11
Control de calidad	12
PRODUCCION MASIVA	13
1° Fase	13
Preparación del medio líquido	13
Inoculación e incubación del medio líquido	13
Fracos erlenmeyer	13
Biofermentador	14
2° Fase	14
Método de producción en bolsas	14
Preparación del sustrato	14
Inoculación del sustrato con el medio líquido	14
De frasco erlenmeyer	14
De biofermentador	15
Incubación del sustrato	15
Método de producción en bandejas	15
Preparación de medio líquido	15
Preparación del sustrato	15
Inoculación del sustrato	15

Incubación en bandejas	16
Pase del hongo a bandeja	16
Secado del hongo antagonista	16
Extracción de conidias	17
Cosecha del biopreparado seco	17
Conservación del biopreparado	17
Control de calidad	17
Control de contaminante	17
Bacterias	18
Fusarium	18
Penicillium	18
Aspergillus	18
Protozoarios	18
Ácaros	18
Control de calidad del producto final	19
Recuento directo de conidias	20
Cámara de Neubauer	20
Porcentaje de germinación o viabilidad	21
Pureza	22
Patogenicidad - Bioensayos	22
Cultivo dual	22
Placa precolonizada	23
REACTIVACIÓN DE CEPAS	24
ANEXO	25
Medios de cultivo	25
Agar Agua (AA)	25
Papa Dextrosa Agar (PDA)	25
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	25
Papa Zanahoria Agar (PZA)	26
Agar Melaza Levadura (AML)	26
Extracto de Malta Agar	26
Agua destilada estéril	26
Medios líquidos	27
Melaza Levadura	27
Medios de montaje	27
Azul de lactofenol	27
Solución Tween	27
CONSERVACION DE CEPAS EN SILICA GEL	28
Principales Ventajas Agrícolas del Uso de Trichoderma	29
Desventajas	29
TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN	30
Metal	30
Calor seco u horno de esterilización	30
Autoclave	30
Puntos para recordar cuando se utiliza la autoclave	30

Uso de la autoclave	30
SEGURIDAD EN EL LABORATORIO	31
Vestimenta	31
Riesgos biológicos	31
Recomendaciones para el empleo de hongos antagonistas	32
Recomendaciones para el almacenamiento de hongos antagonistas	32
Procedimiento para la preparación de hongos antagonistas	33
Aplicaciones foliares	33
Tratamiento de plántulas para el transplante	33
Tratamiento de semillas	34
Siembra en almaciguera	34
Precauciones al aplicar hongos antagonistas	34
BIBLIOGRAFIA	35

## INTRODUCCION

La enfermedad es el resultado de una interacción entre la planta hospedante, el patógeno y los organismos antagonicos que limitan la actividad del patógeno y / o elevan la resistencia de la planta. La mayor causa de pérdida en la producción agrícola, tanto en cosecha como en postcosecha son causados por enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos, como bacterias, nematodos u hongos. Los hongos constituyen uno de los principales grupos tanto por la diversidad de especies existentes como por las pérdidas que originan.

En la actualidad, el control de enfermedades se realiza mediante el uso de fungicidas y fumigantes, que se caracterizan por una elevada eficacia y por una gran rapidez en el control, pero también por ser tóxicos inespecíficos que eliminan junto con los organismos fitopatógenos, otros organismos benéficos, si son usados en forma indiscriminada provocan fungoresistencia, toxicidad y contaminación ambiental.

Los inconvenientes que presenta el control químico se han potenciado en los últimos años debido al cambio en los sistemas de cultivo (monocultivos, explotaciones intensivas, etc.), todo esto unido a una mayor conciencia social ante el enorme deterioro medioambiental debido a la utilización masiva de compuestos químicos, ha provocado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativos. Una alternativa de control viable es la utilización de hongos antagonicos, los cuales son competitivos en la protección de los cultivos de la infección provocada por los hongos fitopatógenos, en especial las especies del género *Trichoderma*, las cuales se están utilizando como agentes de biocontrol en muchos países, siendo formulados y utilizados para el control de varias enfermedades en cultivos de importancia económica. Este hongo actúa como un hiperparásito por medio de una combinación de mecanismos como micoparasitismo, competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, produciendo además sustancias promotoras de crecimiento de las plantas.

Entre los hongos antagonicos que se están desarrollando en nuestro país, se encuentran los del género *Trichoderma* y *Clonostachys* los cuales reducen la incidencia de las enfermedades de varias especies fúngicas de los géneros *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Phytium*, *Phytophthora*, y otros que causan enfermedades en cultivos de importancia económica. Para determinar las medidas de control, es necesario conocer la etiología de la enfermedad, su forma de propagarse y permanecer en el campo, así como los mecanismos de acción que presentan los hongos antagonistas en el control de determinada enfermedad.

La utilización de microorganismos benéficos como hongos antagonistas, involucra una serie de procesos para su producción masiva, desde la preparación del materiales y medios de cultivo, así como técnicas de asepsia para evitar contaminantes, cuyo objetivo principal es la obtención de material que, una vez aplicado en campo, actúe directamente como el estado más infectivo del microorganismo o posibilite la formación de ese estado en el campo.

Este manual tiene como objetivo describir en forma detallada y simple todos los procesos para la obtención de un producto eficiente para ser utilizados en el control de plagas agrícolas.

## HONGOS ANTAGONISTAS

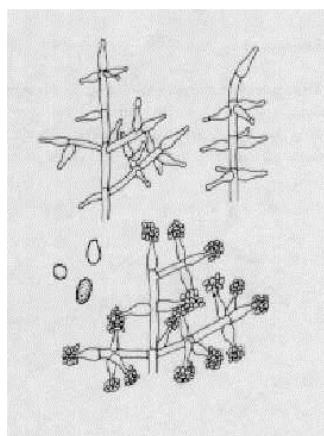
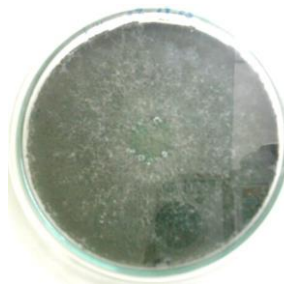
Los hongos antagonistas son componentes naturales del suelo, encontrándose en materiales vegetales en estado de descomposición en numerosos suelos de uso agrícola y tiene la capacidad de adaptarse a varios ambientes. Uno de los géneros más importantes en el control de plagas es *Trichoderma* los cuales actúan contra un amplio rango de hongos fitopatógenos transmitidos por suelo y por aire, usándose en campo e invernadero. Además son más utilizados debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aislados y cultivados ya que no afectan a plantas superiores.

### **TRICHODERMA SPP.**

Son habitantes comunes del suelo, principalmente en suelos ácidos y ricos en materia orgánica. Se aíslan con relativa facilidad y se propagan en diversos sustratos. Son antagonistas eficientes, buenos competidores por nutrientes y presentan un sistema enzimático especializado para parasitar diversos hongos fitopatógenos.

Taxonómicamente pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae. Es un hongo filamentoso cuyo estado teleomórfico corresponde al hongo *Hypocrea* spp. Morfológicamente se compone de conidias y fialides [Larone, 1995]

**Colonias.-** Generalmente desarrollan muy rápido, el micelio es mayormente sumergido, algunas especies presentan micelio aéreo, floculento o algodonoso, el reverso puede ser incoloro, crema, amarillo claro a amarillo oscuro. Conidiación difusa o formando pústulas de color verde



Presentan fialides verticiladas, algunas especies con apéndices terminales en el extremo del conidioforo. Clamidosporas hialinas verdosas. Conidioforo con un eje principal ramificados en forma piramidal.

**Conidias.-** Unicelulares, hialinos a verdes, lisos u ornamentados, subglobosos, ovoides o elipsoidales, acumulados en cabezuelas aparentemente húmedas, frescas y pulverulentas después.

Las especies que se producen y que se utilizan en el control de plagas fitopatógenas son *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *T. virens*, *T. martiale*, *T. asperellum*,

*T. lignorum*

La introducción de *Trichoderma*, en el manejo integrado de plagas por cultivo brinda las posibilidades de explorar las bondades de este hongo como antagonistas del suelo.

## **MECANISMOS DE ACCION DE LOS HONGOS ANTAGONISTAS**

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos sobre la planta. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista. Esto se debe a que los riesgos de seleccionar al patógeno por resistencia al antagonista se reducen al actuar éste último por varios mecanismos. El riesgo de resistencia se reduce también mediante el uso de combinaciones de antagonistas de diferente modo de acción. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. (Cook and Baker 1983).

### **Antibiosis**

Es el proceso en el cual el producto o productos metabólicos de un organismo inhibe directamente o mata o otros organismos. Generalmente estos organismos son saprófitos y tienen una especie blanco no específica y dependen de los recursos de carbono en el suelo. Los antibióticos actúan en áreas no localizadas para mantener su posición en la superficie del sustrato para excluir a los organismos patógenos durante un periodo de tiempo largo (Cate, 1990)

### **Competencia**

Se puede definir como los efectos dañinos de un organismo sobre otro, debido a la utilización de un mismo recurso del medio ambiente. Estos recurso pueden ser nutrientes, oxígeno y espacio. El espacio y el oxígeno son probablemente variables importantes que pueden cambiar a la rizósfera para generar una disminución en el establecimiento de microorganismos patógenos. El carbono, nitrógeno y nutrientes son elementos importantes que determinan el desarrollo e infección de los fitopatógenos en competencia con otros microorganismos. (De Paz, 1997).

### **Micoparasitismo**

Los términos micoparasitismo, hiperparasitismo, parasitismo directo o parasitismo entre hongos son usados con referencia al fenómeno de parasitismo de un hongo sobre otro. El micoparasitismo incluye una gran variedad de interacciones que generan daños morfológicos tales como, cobertura de las hifas del hongo patógeno, penetración y parasitismo directo por la producción de haustorios y lisis de una hifa por otra. (Singh et. al, 1998)

### **Cómo actúan**

Trichoderma al ser aplicado coloniza las raíces, formando una capa protectora sobre ellas, haciendo una simbiosis, el hongo se alimenta de los exudados de las raíces y al mismo tiempo la protege, reduciendo o eliminando las fuentes de alimento del patógeno. Al ser un hongo antagonista, cualquier hongo patógeno que atravesase esa protección, es destruido consumiéndolo y usándolo como alimento. (hiperparasitismo). También actúa como una barrera para prevenir la entrada de patógenos a las raíces.

## **PRODUCCION MASIVA DE HONGOS ANTAGONISTAS.**

La utilización de productos para la protección de enfermedades a base de hongos antagonísticos, implica una serie de acciones las cuales van a determinar la obtención de productos de alta eficiencia en la reducción de las enfermedades para las cuales se están utilizando.

Es importante contar con un producto de alta calidad, virulento y agresivo, de fácil producción, económicos y fáciles de aplicar.

Existen varias metodologías para la producción masiva de hongos antagonistas como la producción industrial, producción semi-industrial y producción artesanal. El método desarrollado por el Laboratorio de Antagonistas de la SCB del SENASA es la producción semi-industrial.

### **PRODUCCIÓN SEMI- INDUSTRIAL**

La producción semi-industrial se realiza en varias fases, que van desde la obtención del cultivo puro hasta la formulación del producto. El proceso consta de dos etapas, cepario y producción masiva.

#### **Cepario**

La etapa de cepario comprende:

- Aislamiento del hongo
- Obtención del cultivo puro
- Obtención de nuevas cepas
- Conservación de cepas.
- Mantenimiento
- Reactivación

#### **Producción**

La etapa de producción comprende:

- Preparación de medio líquido
- Inoculación e incubación de medio líquido
- Inoculación e incubación del sustrato
- Proceso de secado
- Conservación

## **AISLAMIENTO DE HONGOS ANTAGONISTAS**



## Recolección de muestras

Se recolectan hojas, flores, frutos y raíces con síntomas de infección fungal así como suelo recolectado cerca de la raíz o como una toma de muestra para análisis de suelo a 15 a 20 cm de profundidad. Las muestras deben ser enviadas al laboratorio en bolsas de papel, con todos los datos de colección.

### Muestreo de suelo

Se consideran cinco puntos de muestreo, totalizando aproximadamente dos kilogramos de suelo por lote, las muestras deben ser preservadas con hielo hasta su traslado al laboratorio.

## Procesamiento de muestras

Las muestras recolectadas, son llevadas al laboratorio y procesadas para aislar el hongo antagonista de la siguiente manera:

Las hojas, raíces y frutos son lavados con agua de caño para retirar la tierra, luego son desinfectados sumergiéndolos en lejía al 0.5% por 1 minuto, se enjuaga 3 veces con agua destilada estéril, y se seca poniéndolos sobre un papel filtro o toalla estéril. Las muestras así procesadas pueden ponerse en cámara húmeda o sembrarse directamente.

## Aislamiento

**De hojas:** Se cortan pedacitos de hoja de 1 x 1 mm del borde de la lesión hacia fuera y se siembra en placas de Petri conteniendo medio de cultivo, PDA o SDA mas antibiótico al 0.05%, colocando 3 ó 4 pedacitos por placa.

**De raíces:** Se cortan pedacitos de raíces del borde de la lesión y se procede a sembrarlos igual que las hojas

**De frutos:** Se puede sembrar pedacitos de fruto directamente en las placas con medio o poner en cámara húmeda y dejar incubar a medio ambiente por 3 a 5 días hasta observar el desarrollo del hongo antagonista sobre la lesión y luego aislar, sembrando 3 ó 4 puntos por placa.

**De suelo.** Homogenizar la muestra de suelo y pesar 10 g, ponerlo en 90 ml de agua destilada estéril, agitar durante 20 a 30 minutos en un agitador orbital, a 160 ppm, posteriormente se toma 1 mL y se pone a un tubo de prueba conteniendo 9 mL de agua destilada estéril, se realizan diluciones y se siembra 0,1 ml de la dilución  $10^{-4}$ , en placas de Petri conteniendo medio de cultivo PDA o SDA mas antibiótico al 0.05%,

Las placas preparadas se ponen a incubar a 28 °C por 5 a 10 días, hasta que se observa el desarrollo del hongo antagonista si se encuentra presente en la muestra procesada

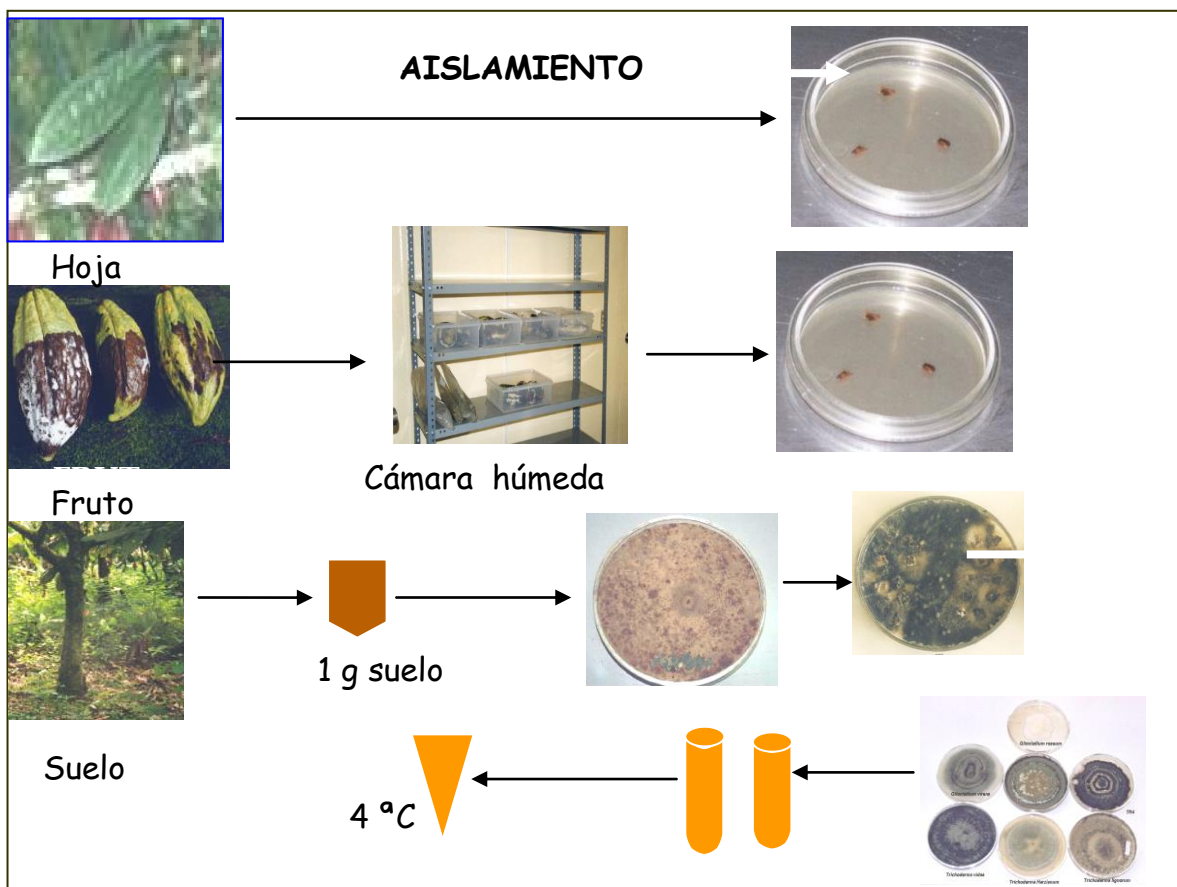
Una vez desarrollado el hongo se hacen montajes en lactofenol y se observa al microscopio para identificar la presencia de *Trichoderma* spp. De las placas mejor

desarrolladas se transfieren a tubos de prueba con PDA o SDA, manteniendo así el hongo aislado.

El criterio para identificar *Trichoderma* es la presencia de esporulación verde típica del género. Una vez identificado el antagonista, se realizaron monocultivos para ser conservados en cepario.

Cuando se desea multiplicar el hongo, se utiliza un tubo para sembrar las placas que necesitamos, manteniendo de esta forma la eficiencia del hongo aislado.

Los tubos preparados, una vez que el hongo ha desarrollado se mantienen a 4 °C, conservándose hasta por un año, repicándose cuando se observe que el medio se ha secado.



### Cultivo monoespórico

Un aislamiento monoespórico es aquel que se obtiene a partir de una espora con un contenido genómico único, que corresponde a un clon genéticamente uniforme de una célula individual, con la finalidad de minimizar la variabilidad genética de los hongos entomopatógenos en producción.

Con el asa de siembra se extraen esporas de una placa bien esporulada, se ponen en 10 ml de Tween 80 al 0.1% y se realizan diluciones hasta obtener la dilución  $10^{-2}$ . Las placas con medio de cultivo que se utilizarán para el

cultivo monoespórico, se preparan marcando unas líneas guía en forma de W en el reverso de la placa con el fin de facilitar la lectura en el microscopio. Se toma una gota de la dilución con un asa de siembra en aro y se deposita en el extremo superior de la estria, arrastrando la gota por la estria dibujada, cuidando de no levantar el asa de siembra. Las placas preparadas se incuban durante 24 horas a  $25 \pm 2$  °C. Con la ayuda de un microscopio se ubica una espora germinada se corta el bloque de agar que contiene la espota y se lleva a un medio nutritivo con antibiótico, llevar a incubar a  $25 \pm 2$  °C por 8 a 10 días, al cabo de este tiempo se seleccionan las colonias monoespóricas sin contaminantes y que presenten las características típicas del hongo sembrado. Los cultivos monoespóricos se conservan a 5 °C utilizándolos cuando sean convenientes.

## **Conservación del cepario**

### **Cepario de conservación**

En el laboratorio, se debe mantener un cepario de conservación y otro de producción. Las cepas o aislamientos procedentes de monocultivos, se conservan en viales o tubos con PDA o PZA a 5 a 9 °C, en trozos de papel con Sílica Gel, se fechan, anotándose el código del aislamiento.



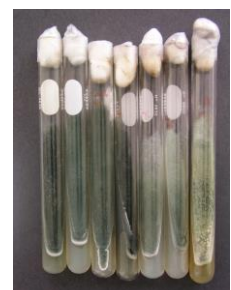
En una ficha aparte se anotará el nombre del patógeno, nombre de la persona que efectuó el aislamiento, lugar, fecha, colector, medio de cultivo utilizado y otros datos de interés.

El “cepario de conservación” es del primer pase del hongo. Si la conservación es en tubos con medio de cultivo, una vez desarrollado el hongo se guardan en refrigeración a temperatura de 4° C, asegurando de esta forma una conservación hasta por un año, en que se realizará el pase a nuevos tubos, si se observa que el medio se ha secado.

Las contaminaciones ocurren con frecuencia incluso en tubos cuidadosamente taponeados, debiendo mantener la asepsia para los trabajos microbiológicos en la siembra e inoculación.

Cuando se realiza un gran número de pases a medios de cultivo, ocurren cambios en las características del hongo, produciéndose también estos cambios cuando se someten a condiciones no adecuadas de pH, temperatura o cuando alguna sustancia o componente no adecuado son usados en el medio de cultivo. El pH debe oscilar entre 5 y 6. Si las cepas se conservan en tubos con medio de cultivo, no deben conservarse por mas de 3 meses en refrigeración.

### **Cepario de producción**



Los tubos de cultivo destinados al “cepario de producción o trabajo” se obtienen del cepario de conservación, estas deben tener un buen desarrollo y estar bien esporulados.

El pase de la cepa a partir de éste, se considera un segundo pase y si a éste a su vez se le da un tercer pase, se deberá reactivar la cepa nuevamente o se tomarán tubos del cepario de conservación.

### **Cultivos puros**

Un cultivo puro es aquel en que está presente únicamente el hongo de interés sin ningún tipo de contaminantes. Los cultivos puros se obtienen a partir del reislamiento del hongo a partir del cepario de producción, el cual es sembrado en placas de Petri conteniendo medio de cultivo PDA o SDA. El cultivo puro es la fuente de inóculo para iniciar el proceso de producción y es utilizado para inocular los medios líquidos.

### **Control de calidad**

El objetivo del control de calidad en esta etapa del proceso de producción es evaluar las características de la cepa que se va a utilizar en la producción y detectar la presencia de contaminantes en los medios de cultivo para su eliminación, lo cual se realiza mediante la observación visual de la cepa y la utilización de medios de cultivo.

Debido a que en la etapa de cepario se trabaja con medios de cultivo de alto valor nutritivo, existen mayores posibilidades que ocurran el crecimiento de microorganismos no deseados, principalmente hongos y bacterias presentes en el ambiente o en otras fuentes de contaminación.

El control de calidad en la etapa de cepario debe realizarse con mucho rigor, debido a que es en esta etapa que se inicia el proceso de producción, de manera que si se selecciona incorrectamente la cepa y el cultivo puro y además existe presencia de contaminantes, esto afectará los siguientes pasos del proceso, lo que al final incide en la calidad y el rendimiento del producto final.

## PRODUCCION MASIVA

La producción masiva de los hongos antagonistas se realiza en dos formas, una en bolsas hasta su comercialización y otra en bandejas en que se obtiene producto seco. Ambos procesos se realiza en dos fases:

### Primera fase

#### Preparación del medio líquido

Para ambos métodos de producción en bolsa o bandeja la preparación del medio líquido es el mismo

El medio líquido utilizado para la producción masiva, de hongos antagonistas es el medio melaza – levadura de cerveza.

Este medio puede prepararse en frascos erlenmeyer o matraces a razón de 650 ml por frasco de 1000 ml, se cubren con papel platina y se esteriliza a 121 °C y 15 lbs de presión por 1 hora. (Ver Anexo).



En biofermentadores, en uno de 20 litros, se preparan 15 litros de medio, se esterilizan en autoclave por una hora a 121 °C y 15 lbs de presión. La esterilización se realiza con los filtros cerrando las mangueras con una pinza antes de los filtros, para evitar que se mojen al momento de la esterilización



#### Inoculación e incubación del medio líquido.

##### En frascos erlenmeyer

Una vez fríos los medios líquidos, se llevan a la cámara de flujo laminar y se le agrega 0.1 g de cloranfenicol o estreptomicina, luego se toma una placa totalmente esporulada y se corta en cuatro partes, cada cuarto se corta en trozos pequeños y se agregan en un frasco con medio de cultivo. Una placa sirve para preparar 4 frascos con medio líquido. Se cubre con el papel platina sellando con cinta parafilm y se llevan a un agitador orbital a 160 rpm por 3 días a la temperatura de 24 a 27 °C



### **En biofermentador**

Una vez frío el biofermentador, se lleva a la cámara de flujo laminar y se le agrega 1 ml de ácido láctico por litro de medio y 01 g de antibiótico por litro (cloranfenicol o sulfato de estreptomicina) y se siembra con una solución de esporas que se obtiene de placa bien esporulada, la cual se prepara del mismo modo que para los frascos erlenmeyer. Una vez inoculado se quitan las pinzas y a la manguera de uno de los filtros se le coloca un motor de pecera para su agitación por 3 días, a temperatura de 24 a 27 °C



### **Segunda fase**

### **MÉTODO DE PRODUCCIÓN EN BOLSAS**

#### **Preparación del sustrato**

En este método el proceso de germinación, colonización y esporulación, se realiza en la misma bolsa. El procedimiento es el siguiente:

Se prepara el agua destilada a utilizarse en las bolsas de arroz, adicionando 2 gramos de urea por cada litro de agua. En una bolsa de polipropileno de 11 x 16 pg x 2 micras, se pone 830 gr de arroz, se le agrega 200 ml de agua destilada, se hacen dos dobleces a la bolsa y se engrapa en los extremos, luego se mueve la bolsa para distribuir el agua a todos los granos de arroz. Se esteriliza en la autoclave a 121°C y 15 lbs de presión por 45 minutos. Después de esterilizadas las bolsas, se agitan con el objetivo de evitar aglomeraciones. (para que el inóculo se distribuya uniformemente en el arroz y se obtenga un desarrollo homogéneo del hongo en producción). La agitación de las bolsas se realiza con guantes térmicos.



#### **Inoculación del sustrato con el medio líquido**

##### **De frascos erlenmeyer**

Una vez frías, las bolsas con el sustrato se llevan a la cámara de flujo laminar, se desinfecta el borde de cada bolsa con un algodón embebido en alcohol, se abre cuidadosamente la bolsa y se inocula con 30 ml del caldo líquido agitado. Se cierra nuevamente la bolsa y se agita para distribuir el inóculo en todos los granos de arroz. Con el inóculo líquido obtenido de cada frasco se inoculan aproximadamente 20 bolsas.





### De biofermentador

La siembra se realiza con una jeringa multidosificadora, utilizando 30 ml para la producción en bolsas y 50 ml para la producción en bandejas.



### Incubación del sustrato

Las bolsas inoculadas son llevadas a la sala de germinación la cual tiene una temperatura de 24 a 27 °C, incubándose en oscuridad los primeros 3 días para favorecer el desarrollo del micelio. Al segundo día de incubación, las bolsas son agitadas suavemente para favorecer la oxigenación de todo el sustrato y son dejadas de 5 a 8 días hasta completar la esporulación. Con la finalidad de secar el producto, se abren las bolsas por el centro, con lo que se consigue bajar la humedad a 30 - 35%



En esta etapa se revisan las bolsas diariamente, eliminando las que presenten crecimiento lento y desuniforme, crecimiento débil así como las bolsas con presencia de contaminantes

### MÉTODO DE PRODUCCIÓN EN BANDEJAS

En este proceso la germinación y desarrollo vegetativo del hongo se realiza en las bolsas y el proceso de colonización y esporulación se realiza en bandejas.

#### Preparación de medio Líquido:

Igual que el procedimiento anterior

#### Preparación del sustrato.

La preparación del sustrato arroz es igual al procedimiento anterior, variando la cantidad de agua que se utiliza para humedecer el arroz, así para 950 gramos de arroz se agrega 500 ml de agua destilada (Seguir el procedimiento descrito anteriormente)

#### Inoculación del sustrato

La inoculación de las bolsas se realiza agregando 50 ml de medio líquido por bolsas

(Seguir el procedimiento descrito anteriormente)

#### Incubación en bandeja



Las bolsas preparadas se incuban por 48 horas a una temperatura de 24 a 26 °C, luego se seleccionan las bolsas que presentan un buen desarrollo micelial y libres de contaminantes y se procede a su pase a bandejas

### **Pase del hongo a bandeja**

Con una tijera desinfectada con alcohol se cortan las bolsas por debajo de las grapas y se pasa el arroz con el hongo a bandejas que han sido previamente desinfectadas para lo cual las bandejas se limpian y humedecen con alcohol y se flamean con el mechero.

Se extiende el arroz en las bandejas, para favorecer la colonización y esporulación del hongo y se dejan en incubación a 27 °C y 80% HR por 5 días.

También el hongo puede tenderse en mantas de plástico, limpias y desinfectadas con alcohol.



**Pase del arroz a bandejas    Extendido del arroz    Esporulación del hongo**

### **Secado del hongo antagonista**

Una vez que el hongo ha esporulado cubriendo toda la bandeja, se realiza su secado a temperaturas bajas por un periodo de 5 a 6 días, tiempo suficiente para bajar la humedad del arroz a 15% de humedad. El área de secado cuenta con aire acondicionado y se realiza ajustando la temperatura en 17 ó 19 °C.



### **Extracción de conidias**

Consiste en separar del arroz las conidias del hongo y recolectarlas para su posterior formulación. La cosecha extracción de conidias puede realizarse en equipos mecánicos como el Mycoharvester o en forma manual utilizando tamices mas frotación, en que se cosechan pequeñas cantidades con fines de ensayos.





La conidias cosechadas son afectadas por la luz, humedad y altas temperaturas, por lo que una vez cosechado el hongo debe conservarse en refrigeración para mantener su viabilidad.

### **Cosecha del hongo antagonista seco.**

El producto final es cosechado, embolsado y sellado. El rendimiento de esporas por kilo está en función a la especie producida, pudiendo llegar a obtenerse concentraciones de  $1 \times 10^{13}$  a  $1 \times 10^{14}$  con/k (*Trichoderma spp.*)

Para la cosecha utilizar vestuario de bioseguridad, (mascarilla, guantes, lentes, mameluco descartable ó lavable)



### **Conservación o almacenamiento del hongo antagonista o producto final**

El producto final se almacena a temperaturas de 18 – 19 °C para conservar inalterables las características del ongo por más tiempo.

## **CONTROL DE CALIDAD**

En la producción masiva, hay una serie de aspectos de control de calidad que se deben tomar en cuenta, como el control de contaminantes durante el proceso de producción, revisando la viabilidad, concentración o número de conidias por gramo de producto y virulencia del producto final.

### **Control de contaminantes**

Uno de los aspectos más críticos de la producción masiva es asegurarse de que la contaminación del producto sea evitado a toda costa. Se considera contaminante a todo aquel tipo de microorganismo no deseado que se desarrolla en el medio de cultivo del hongo antagonista. Generalmente los contaminantes siempre están presentes en el ambiente y en los materiales empleados en el laboratorio y se presentan cuando no se cumplen las normas de trabajo en el laboratorio. Aún bajos niveles de contaminación de hongos contaminantes como *Aspergillus* o *Penicillium spp.*, son completamente inaceptables en el producto final.

Los contaminantes afectan al hongo que se está produciendo compitiendo con los nutrientes del medio y espacio que debería ocupar el hongo antagonista, además los contaminantes se pueden comportar como hiperparásitos, es decir se alimentan del hongo en producción, además pueden producir sustancias que inhiben el crecimiento y la formación de estructuras reproductivas.

El control de contaminantes, se inicia haciendo revisiones regulares en las que se determinan la aparición de contaminantes durante el proceso de producción masiva. Este debe se realizado en cada fase de producción, desde la evaluación del tubo o placa que se utilizará en la producción masiva, hasta el producto final una vez que el hongo ha desarrollado completamente sobre el sustrato.

Los contaminantes más comunes son:

**Bacterias:** Son los contaminantes más importantes en el proceso de producción masiva, de acuerdo a la especie presentan colonias redondeadas, translúcidas de coloración amarillenta, rosada o lechosa, desarrollando muy rápido en el medio de cultivo observándose al segundo día después de sembradas las placas. Estas bacterias desarrollan también en las bolsas sembradas, las que se despiden mal olor, descomponiéndose muy rápidamente. Las bacterias más comunes son los bacilos y cocos, encontrándose también levaduras.

**Fusarium:** Las colonias de este hongo pueden tener diferentes coloraciones o presentar pigmentaciones en el medio en que se encuentran estas pueden ser: naranjas, rosadas, amarillas, crema, violáceas y producen dos tipos de conidias, macro y micro conidias.

**Penicillium:** Conidióforos largos, septados, lisos o rugosos, individuales o en sinemas, ramificado cerca del ápice en uno, dos o más verticilos, que le dan aspecto de una escoba, ramas terminadas en fiálides o células fértiles productoras de conidias, conidias producidos basipetalamente y unidas en cadenas, los conidias son globosos a elípticos, lisos o equinulados.

**Aspergillus:** Es un hongo patógeno al hombre porque es cancerígeno, tiene conidióforos hialinos rugosos o reticulados y con vesículas globosas, cabezuelas conidiales globosas verde o verde amarillentas, esterigma en una o dos series a veces hasta en una misma vesícula. Conidias globosos a ovales.

**Protozoarios:** Pueden presentarse bajando el rendimiento de la producción, estos microorganismos son difíciles de diagnosticar, pudiendo encontrarse infectando a nivel de cepa.

**Ácaros:** Los ácaros de los géneros *Tyrophagus* y *Tarsonemus*, son contaminantes comunes en todo laboratorio, estos invaden e infestan cultivos en tubos, placas de Petri y bolsas de biopreparado. Se alimentan de los hongos y a menudo los infectan con diversas bacterias u otros contaminantes al deambular desde un cultivo a otro. Los ácaros son atraídos por el aroma de los hongos, siendo introducidos al laboratorio en el cuerpo de las moscas o de otros insectos, en plantas frescas, en suelo o por el mismo trabajador. Si se observan en placas, tubos o bolsas, estas deben eliminarse inmediatamente en la autoclave, pues estos ácaros se diseminan muy rápidamente.

Para evitar el crecimiento de bacterias se le debe de agregar al medio un antibiótico como penicilina, cloranfenicol y regular el pH por medio de la adición de ácido láctico, cuando el daño por bacterias es elevado es recomendable fumigar el lugar de trabajo con formalina o poner lámparas de luz ultravioleta que ayudan a eliminar las bacterias y hongos que se encuentran en el medio ambiente y esterilizar todo material que se utilice en el proceso de producción

El reconocimiento de algunos hongos y bacterias contaminantes de laboratorios se puede basar en el crecimiento característico. El crecimiento de algunos hongos y bacterias contaminantes se observa por la presencia de puntos con diferentes formas de coloración, si el crecimiento del hongo antagonista es lento

y seco y se forman colonias cuya coloración varia en colores como rojo, amarillento, verde pálido, crema, entonces se trata de hongos.

Cuando la contaminación es por bacterias, el hongo antagonista no logra crecer en el sustrato por completo debido a que el crecimiento de la bacteria es más que el del hongo, además se forma una masa suave, y pueden aparecer en el sustrato manchas de color rojo, cremas y/o amarillentos. Además las bacterias tienen la característica de presentar un olor fuerte y desagradable. En cambio los hongos tienen la cualidad de presentar olor característico a fermentación fuerte, el que se diferencia del olor característico de los hongos antagonistas.

Una forma de determinar la presencia de hongos y bacterias contaminantes, es poner placas de Petri con medio de cultivo PDA o Agar Nutritivo, abiertas dentro de la cámara de flujo laminar, sobre la superficie de las mesas, dentro de la incubadora, etc., estas placas se dejan por 30 minutos, luego se cierran y se incuban. Los contaminantes que desarrollan más rápido son las bacterias y después comienzan a desarrollar los hongos.

El mejor método de control para evitar los diversos tipos de organismos contaminantes es la asepsia e higiene general del laboratorio, limpiando diariamente los pisos mesas, estantes, así mismo la incubadora se debe limpiar semanalmente con alcohol 70 % interna y externamente.

### **Control de calidad del producto final**

Es el proceso por el cual se determina la calidad del biopreparado o producto final obtenido, registrando el número de conidias por gramo de sustrato, viabilidad, pureza, virulencia y patogenicidad

Para que el biopreparado sea considerado de buena calidad, debe reunir ciertos parámetros establecidos por organismos encargados de regular la calidad de estos productos. Estos parámetros son:

- Concentración de conidias : mayor o igual a  $10^9$  conidias por gramo o mililitro
- Porcentaje de germinación o viabilidad : mayor o igual al 95%
- Pureza : 100%
- Bioensayos

### **Recuento directo de conidias**

Se determina la cantidad de conidias típicos del hongo antagonista presente en 1 g de producto final, el procedimiento es el siguiente:

De cada 10 bolsas preparadas, se toma una bolsa al azar y se lleva a la cámara de flujo laminar, se abre y se toma 1 g, el cual se pone en una bolsita estéril conteniendo 10 ml de Tween al 0,1%, en este caso la suspensión corresponde a  $10^{-0}$ , se agita bien para mezclar durante 1 minuto.

Este mismo procedimiento se realiza también en un tubo de prueba, que contiene 10 ml de Tween al 0,1% agitando en un vortex por 1 minuto.

Luego se realiza la dilución  $10^{-1}$  tomando 1 ml de la bolsita (dilución  $10^{-1}$ ) o del tubo y se le adiciona a un tubo de prueba que contiene 9 ml de Tween al 0.1% y así sucesivamente hasta conseguir la dilución  $10^{-2}$ . Es aconsejable que por cada dilución que se haga, el tubo de la dilución correspondiente se agite durante 30 segundos en un vortex.

Con una pipeta Pasteur, se toma una muestra de la última dilución y se llena la cámara de Neubauer pro capilaridad. Llevar al microscopio y proceder a contar las conidias en el cuadrante central de la cámara. Contar cinco cámaras y determinar la concentración de conidias por ml mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Nº conidias/ml} = X \cdot \overline{\quad} \cdot 10^4 \cdot \text{ID}$$

$\overline{\quad}$  = N° cuadraditos contados en el cuadrante central

$X$  = Promedio de conidias contadas

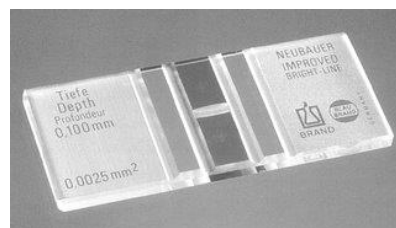
ID = Inversa de la dilución empleada

Para obtener el número de conidias por gramo del producto, se multiplica el promedio del número de conidias por mililitro obtenido en el recuento, por el volumen empleado en la preparación de la suspensión  $10^{-0}$  y se divide por el peso de la muestra utilizada.

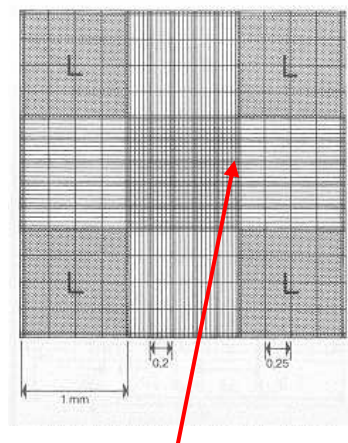
Si el producto tiene una concentración de conidias/ g  $\geq$  de  $10^9$ , está apto para ser utilizado en campo.

### Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula, correspondiente a un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm.



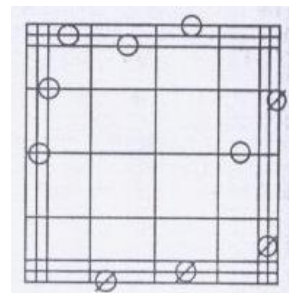
Así el área sombreada marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjeto éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjeto es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro que es igual a 0,0001 cm<sup>3</sup>



**Cuadrante medio central**

El conteo de conidias se realiza en el cuadrante medio central, contando cinco cuadraditos, los 4 de las esquinas y el centro

En cada cuadradito del cuadrante medio central se cuentan todas las conidias que se encuentran dentro y además las conidias que se encuentran en las líneas de borde superior e izquierda del cuadradito, no se cuentan las conidias que se encuentran en las líneas de borde inferior y derecha (Ver figura)



### Porcentaje de germinación o viabilidad

Con esta prueba se determina el porcentaje de conidias típicas del hongo que está en condiciones de germinar en un período de tiempo determinado, después de ser sembrado en medio de cultivo para hongos. La metodología es la siguiente:

Se toma 0,2 ml de la última dilución y se siembra en placas de Petri conteniendo PDA, incubar durante 15 horas. Luego en la cámara de flujo laminar con la ayuda de un asa, cortar una porción de agar de mas o menos 1 cm<sup>2</sup> y colocarla sobre un portaobjeto, adicionar una gota de azul de lactofenol y cubrir con un cubreobjeto. Sacar de esta manera 5 muestras por placa, llevar al microscopio y realizar el recuento de conidias germinadas y no germinadas, contando como mínimo 200 conidias por cada muestra.

Registrar los datos, sacar el promedio de las 5 lecturas y calcular el porcentaje de conidias germinados y no germinados, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = \frac{a}{a + b} \cdot 100$$

a = número de conidias germinadas

b = número de conidias sin germinar

Si el resultado es igual o superior al 90 % se considera que la viabilidad del producto es satisfactorio.

### Pureza

Se determina si el producto final es puro o contiene contaminantes indeseables. La metodología es la siguiente:

Se procede a realizar diluciones seriadas hasta 10<sup>-11</sup>, se siembra 0.2 ml de la última dilución en placas conteniendo medio de cultivo SDA o PDA, sembrar tres placas, incubar durante cinco días a temperatura de 25 ± 2° C. Evaluar y sacar el promedio del número de unidades formadoras de colonias UFC de los contaminantes y el número de UFC del hongo evaluado. Multiplicar por la inversa de la dilución y el volumen empleado. Aplicar los datos obtenidos a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Pureza} = \frac{\text{UFC h e}}{\text{UFC t}} \cdot 100$$

UFC he = Unidades Formadoras de Colonias del hongo evaluado  
 UFC t = Unidades Formadoras de Colonias totales

### **Patogenicidad - bioensayos**

Es la prueba más importante en el control de calidad de un biopreparado ya que permite determinar si el hongo antagonista controla al patógeno para el cual está recomendado. Sin embargo no asegura que bajo condiciones de campo su eficiencia sea igual a la registrada en el laboratorio.

Puede realizarse mediante dos metodologías:

**Cultivo dual**, que consiste en enfrentar al hongo fitopatógeno con el hongo antagonista. Para lo cual se deben preparar placas con medio de cultivo con el hongo fitopatógeno y con el hongo antagonista y se dejan incubar por 3 días.

Después de este tiempo se sacan discos de 0,5 cm con la ayuda de un sacabocado estéril y en una placa con PDA, se siembra un disco de *Trichoderma* en un extremo de la placa y en el otro extremo un disco similar con el desarrollo del patógeno a evaluar. Se preparan tres placas, se incuban por 4 a 6 días y luego se mide el crecimiento lineal de cada colonia al enfrentarse una con otra, valorando la actividad competitiva por el sustrato.



El valor promedio de crecimiento lineal de *Trichoderma* es de 5 a 6 cm en comparación con el hongo fitopatógeno evaluado. También se puede observar hiperparasitismo y en muchos casos incremento de la esporulación cuando el antagonista crece sobre la colonia del patógeno.

### **Placa precolonizada**

Se prepara una suspensión de esporas de los hongos fitopatógenos a evaluar utilizando 10 ml de Tween al 0,1%, luego se realizan las diluciones hasta  $10^{-4}$ , se toma 0.1 ml de la suspensión y se siembra en placas de Petri conteniendo PDA mas antibiótico 0.1 g por litro de medio, esparcir la suspensión con ayuda de una pipeta estéril e incubar a  $25 \pm 2$  °C hasta obtener la colonización total de la placa, dependiendo del hongo patógeno puede ser de 5 a 15 días. Preparar tres placas.

Una vez obtenidas las placas colonizadas con el hongo patógeno, se toman las placas con los hongos antagonistas esporulados y se cortan tiras de 5 x 25 mm, se colocan en forma invertida en un extremo de la placa con el hongo patógeno. Se preparan 3 placas para cada hongo antagonista en evaluación y se llevan a incubar a  $25 \pm 2$  °C por 24 horas, al cabo de las cuales se comienza a evaluar el efecto antagónico de *Trichoderma*, para lo cual con la ayuda de una plantilla se cortan tiras de 7,5 cm de largo por 5 mm de ancho comenzando del extremo en donde se encuentra la tira con el hongo antagonista. Cada tira es cortada en cuadraditos de 5 x 5 mm y transferida a una placa vacía en cuyo fondo con la ayuda de una plantilla se



marcan puntos del 1 al 15 comenzando con el número 15 que corresponde al extremo opuesto a la tira con el hongo antagonista.

Una vez colocadas todos los cuadraditos, se coloca la tapa en cuya cara interior se ha colocado un disco de papel toalla estéril humedecido con 2 ml de agua destilada estéril, luego se pone a incubar a medio ambiente durante 24 horas, luego de los cuales se procede a evaluar el desarrollo del antagonista sobre el patógeno, observando cada cuadradito bajo el microscopio. De esta manera se evalúa que hongo antagonista es el mas adecuado para su utilización en el control del hongo patógeno problema.



### Reactivación de cepas

Se sigue el procedimiento anterior utilizando el hongo patógeno blanco con la finalidad de reactivar la virulencia y patogenicidad del hongo antagonista en producción. Las cepas utilizadas para producción deber ser de un tercer subcultivo, siendo necesario reactivarlas periódicamente.



## ANEXO

### MEDIOS DE CULTIVO

#### 1. Agar - Agua ( AA)

Agar - 20 g  
Agua destilada - 1,000 ml

- Disolver el agar en el agua destilada
- calentar en baño maría o microonda y distribuir en erlenmeyer de 500 ml a razón de 250 ml.
- Tapar con una torunda de algodón y papel aluminio.
- esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión por 20 minutos

Se utiliza para aislamientos monoespóricos y para porcentajes de germinación.

#### 2. Papa - Dextrosa - Agar ( PDA)

Papa                                250 g  
Dextrosa                        18 g  
Agar                                18 g  
Agua destilada    1000 ml

Preparación:

- Lavar la papa, pelarla, pesarla, picarla en trozos pequeños
- Ponerla a hervir en 1000 ml de agua destilada, por más o menos 35 minutos.
- Filtrar a través de una gasa.
- Completar a un litro y agregar el agar y la dextrosa, mezclar bien.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad a razón de 250 ml por frasco,.
- Taponar con algodón y papel platina
- Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

#### 3. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

SDA                                65 g  
Agar                                5 g  
Agua destilada    1000 ml

- Agregar el SDA y el agar en el agua destilada.
- Calentar la mezcla en baño maría hasta disolver.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml de capacidad a razón de 250 ml por frasco.
- Taponar con una torunda de algodón y papel aluminio y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

El SDA es un medio de cultivo que se vende preparado y es utilizado para el aislamiento de diferentes hongos.



#### 4. Papa Zanahoria Agar (PZA)

Zanahoria sin cáscara	20 g
Papa sin cáscara	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

- Lavar en agua corriente la papa y la zanahoria,.
- Rallarlos y hervir en 1000 ml de agua destilada durante 1 hora.
- Colar a través de una malla fina, sin presionar.
- Añadir el agar, calentar en baño maría, hasta que el agar se disuelva y enraizar a 1 L con agua destilada.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml a razón de 250 ml.
- Tapar con una torunda de algodón y papel aluminio.
- Esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión por 15 minutos

#### 5. Agar Melaza Levadura (AML)

Melaza	15 g
Levadura de cerveza	10 g
Agar	20 g
Papa amarilla	200 g
Agua destilada	1000 ml

- Cortar la papa en cubos de 1 cm y lavar en agua corriente.
- Hervir 800 ml de agua destilada y agregar los cubos de papa, dejando cocinar cuidando de que no se deshagan.
- Vaciar el caldo a un vaso de precipitado y dejar reposar por 5 minutos.
- Extraer el sobrenadante y filtrarlo a través de una gasa o algodón con la ayuda de un embudo.
- Agregar la melaza estéril, la levadura de cerveza y enraizar con agua destilada hasta completar 1 L.
- Ajustar el pH a 5,5 con ácido láctico.
- Agregar el agar y disolver en baño maría.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 500 ml a razón de 250 ml, tapar con una torunda de algodón y papel aluminio.
- Esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión por 15 minutos

La melaza se prepara con anticipación, para lo cual se disuelve en 250 ml de agua destilada y se esteriliza a 121 °C y 15 lbs de presión por 20 minutos

#### 6. Extracto de Malta Agar (EMA)

- Hervir 20 g de extracto de malta en 1 L de agua hasta disolverlo
- Añadir 20 g de agar
- Hervir hasta que el agar se disuelva
- Esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión por 15 minutos

#### 7. Agua destilada estéril (ADE)

Esterilizar agua destilada a 121 °C y 15 lbs de presión por 20 minutos

## **MEDIOS LÍQUIDOS**

### **Melaza Levadura (Mel/Lev)**

Melaza	30 g
Levadura de cerveza	5 g
Agua destilada	1000 ml

- Añadir la melaza (previamente esterilizada por 1 hora), en el agua y agitar hasta disolver.
- Añadir la levadura de cerveza y agitar hasta homogenizar bien.
- Distribuir en frascos erlenmeyer de 1000 ml a razón de 650 ml
- Tapar con papel aluminio y esterilizar a 121 °C y 15 lbs de presión por 1 hora.
- Dejar enfriar a medio ambiente

### **Medios de montaje**

#### **Azul de lactofenol**

Fenol en cristales	:	20 g
Acido láctico	:	20 ml
Glicerol	:	40 ml
Agua destilada	:	20 ml
Azul de algodón	:	0,03 g

Disolver el fenol en agua destilada tibia, agregar el ácido láctico y la glicerina, mezclar bien. Agregar el azul de algodón.

También puede usarse azul de metileno en lugar del azul de algodón.

#### **Solución de Tween 80 al 0,1%**

Para el control de calidad de la producción se utiliza una solución conteniendo Tween al 0,1%. Esta solución tiene la propiedad de soltar las conidias, haciendo más fácil su dispersión para todos los procesos del control de calidad y bioensayos.

Se prepara de la siguiente manera :

Tween 80	:	1 ml
Agua destilada	:	1000 ml

Mezclar el agua con el Tween, mover bien hasta homogenizar. Verter en frascos de vidrio (250 ml) resistentes al calor, a razón de 100 ml por frasco, tapar con papel platina y esterilizar en autoclave a 121° C y 15 libras de presión por 15 minutos.

Esta solución puede prepararse y guardarse en refrigeración hasta ser utilizada

## CONSERVACIÓN DE CEPAS EN SILICA GEL

### Esterilización del silicagel

- Poner 3 g de silicagel con indicador de humedad, en frasquitos de vidrio de 10 ml
- En la boca del frasco colocar un cono hecho de cartulina y taparlo con papel aluminio.
- Esterilizar en el horno durante 1 hora a 180 °C.

### Suspensión e inoculación del hongo

- En la placa esporulada del hongo, verter 10 ml de leche estéril al 20%.
- Con la ayuda de una espátula raspar la superficie de la placa y homogenizar.
- Con una pipeta verter la suspensión en una placa de Petri estéril, y con la ayuda de la pinza estéril sumergir pedacitos de cartulina estéril (aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup>).
- Extraer con la pinza los pedacitos de cartulina humedecidos en la suspensión con el hongo y colocarlos en una placa de Petri estéril para que sequen a temperatura ambiente, durante 24 horas.
- Transcurrido ese tiempo se colocarán aproximadamente 30 pedacitos de cartulina inoculada con el hongo, en cada uno de los conos de cada frasco, enseguida se reemplazará la tapa de papel aluminio por la tapa de rosca estéril.
- Posteriormente los frascos son colocados a temperatura de 5 °C para su conservación.



### Conservación de cepas en Sílica Gel

### **PRINCIPALES VENTAJAS AGRÍCOLAS DEL USO DE *Trichoderma***

- Control eficaz de enfermedades de plantas
- Posee un amplio rango de acción
- Se propaga rápidamente en el suelo, aumentando sus poblaciones y ejerciendo control duradero sobre hongos fitopatógenos.
- Ayuda a descomponer la materia orgánica haciendo que los nutrientes se conviertan en formas disponibles para las plantas, teniendo un efecto indirecto en la nutrición el cultivo.
- Estimula el crecimiento de los cultivos, ya que poseen metabolitos que promueven los procesos de desarrollo de las plantas.
- Se aplica al compostaje o materia orgánica en descomposición para acelerar el proceso de maduración de estos materiales, los que contendrán el hongo cumpliendo su función de biofungicida.
- Favorece la proliferación de organismos benéficos en el suelo, como otros hongos antagonistas.
- No necesita de plazo de seguridad para recolección de la cosecha.
- Preserva el medio ambiente al disminuir es uso de fungicidas.
- Previene enfermedades dando protección a la raíz y al follaje.
- Mejora la nutrición y la absorción de agua al promover el crecimiento de raíces y pelos absorbentes.
- Tiene acción como biodegradante de productos tóxicos
- Mayor seguridad en relación a los productos químicos
- No se acumulan en la cadena alimenticia
- Su persistencia y multiplicación evitan aplicaciones repetitivas
- Raramente desarrollan resistencia

#### **Desventajas:**

- Variabilidad genética del agente
- Experimentación larga: laboratorio, invernadero, campo
- Resultados afectados por; suelo clima, otros micro organismos

## **TÉCNICAS DE ESTERILIZACION**

### **Metal**

Esterilizar estiletes, asas de siembra, etc. calentándolos en la llama del mechero hasta que estén rojos

### **CALOR SECO U HORNO DE ESTERILIZACIÓN**

Se utilizan para esterilizar placas de Petri o tubos de prueba que se utilizaran durante el proceso de producción de hongos. Los materiales de vidrio deben ser envueltos en papel kraft o papel bond, las placas se envuelven en número de 2 o 3 sin apiñarlos. El tiempo de esterilización es de 1 hora a 180°C

### **AUTOCLAVE**

Se utiliza la autoclave a 15 libras de presión por 15 - 20 minutos para medios de cultivo y por 30 a 45 minutos para sustratos sólidos. El tiempo requerido para la esterilización está dada en las instrucciones de esterilización de los diferentes medios.

### **PUNTOS PARA RECORDAR CUANDO SE USA LA AUTOCLAVE**

- Use agua destilada o agua blanda en la autoclave
- Asegúrese que los frascos y tubos sean a prueba de calor
- Nunca llene los frascos y tubos hasta el borde, siempre deje un espacio entre el líquido y el borde para permitir que el líquido se expanda al hervir
- Suelte las tapas de los frascos y tubos, antes de ponerlos en la autoclave, esto permite que el vapor entre a los envases y esterilice los contenidos
- Siempre lea las instrucciones del fabricante antes de usar la autoclave.

### **USO DE LA AUTOCLAVE**

1. Ponga suficiente agua, debe cubrir la resistencia
2. Cargue los artículos a ser esterilizados dentro de la autoclave
3. Cierre herméticamente la tapa
4. Abra la válvula de vapor
5. Prenda la llave de encendido
6. Deje que el vapor salga por los menos cinco (5) minutos antes de cerrar la válvula de vapor. Continúe calentando hasta que la presión alcance 15 lbs
7. Ajuste la presión y gradúe el calor mediante el botón de encendido
8. Deje el tiempo recomendado para la esterilización y luego apague la autoclave
9. Deje que enfíe para reducir la presión a cero
10. Abra la válvula de vapor y libere cualquier remanente de presión
11. Espere cinco (5) minutos antes de abrir la tapa

**Recuerde: Nunca abrir la autoclave hasta que la válvula ha sido abierta para liberar la presión**

## **SEGURIDAD EN EL LABORATORIO**

**PROHIBIDO FUMAR**  
**PROHIBIDO COMER**  
**PROHIBIDO BEBER**

1. Conservar las mesas de trabajo limpias y ordenadas
2. Conservar los pisos limpios
3. Lavar y almacenar adecuadamente los materiales de vidrio
4. Almacenamiento de los medios de cultivo, insumos y materiales en lugares apropiados (aparadores, almacenes)
5. Mantenimiento de los equipos

### **VESTIMENTA**

Siempre se debe usar el tipo adecuado de ropa de protección como:

- Guardapolvos y /o mandiles de laboratorio
- Máscaras faciales y guantes en los procesos de producción

### **RIESGOS BIOLÓGICOS**

Los hongos antagonistas usados para el control de enfermedades son muy seguros, PERO pueden causar reacciones alérgicas si son inhalados.

Algunos contaminantes comunes como *Aspergillus* spp. y bacterias son peligrosos.

Los que trabajan en el laboratorio deben aprender a reconocer y disponer de los contaminantes en forma segura.

SIEMPRE conservar las mesas, equipos y ropa de protección limpios.

## RECOMENDACIONES PARA EL EMPLEO DE HONGOS ANTAGONISTAS

- Los hongos antagonistas se emplean como preventivos, para proteger a los cultivos antes de que la enfermedad se desarrolle. Se utilizan en aspersión y como cobertura de semillas antes de ser sembradas, al momento del transplante y en el agua de riego, especialmente si este es por goteo ya que así protegerá a las raíces y cuello de la planta del ataque de los hongos de suelo, en aplicaciones foliares cuando se detectan los primeros síntomas de infección por hongos fitopatógenos.
- La programación de aplicación de los hongos antagonistas no debe coincidir con aplicaciones de fungicidas, azufrados, etc.
- En el empleo de los hongos antagonistas, se debe tener en cuenta la materia orgánica existente en el suelo ya que esta ayudará al desarrollo de los hongos antagonistas ejerciendo un mejor control de la enfermedad. Utilizar agua potable, de río o de pozo (las aguas turbias, de río o de pozo, se deben dejar reposar por lo menos 30 minutos antes de utilizarla).
- La dureza y la acidez del agua son factores importantes para el buen funcionamiento de los hongos antagonistas; la dureza debe ser menor a 150 ppm (carbonates) y el pH menor de 7. El empleo de ablandadores de agua disminuyen la dureza, bajando también el pH. Las aguas duras inhiben la germinación de las conidias.
- La aplicación de los hongos antagonistas debe hacerse, preferentemente, por la tarde, cuando la radiación solar no es muy fuerte.
- El éxito de la aplicación y el control con hongos antagonistas depende también de la elección de los equipos de aspersión. Se utilizan equipos (mochilas) convencionales, utilizando boquilla cónica de gotas finas, de tal manera que se obtenga una aplicación uniforme mojando bien la planta. Los equipos deberán ser nuevos o limpios, libres de residuos químicos, los cuales inhiben la viabilidad de las conidias. Tener especial cuidado en la limpieza del equipo cuando anteriormente se ha utilizado para la aplicación de fungicidas.

## RECOMENDACIONES PARA EL ALMACENAMIENTO DE HONGOS ANTAGONISTAS

Los hongos antagonistas por ser microorganismos vivos requieren de condiciones de almacenamiento óptimo. Al recibirlos, trasladarlos inmediatamente al lugar en donde permanecerán hasta su uso, debiendo ser retirados de las cajas y colocados en anaqueles en forma individual, **no apiñada**, este lugar debe estar libre de polvo, debiendo realizar la limpieza del piso con un trapeador con lejía sin barrer para evitar levantar el polvo, y los anaqueles deben limpiarse con alcohol comercial.

Si las condiciones de almacenamiento no son los adecuados, pueden producirse contaminaciones con hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, que por ser de coloración verdosa pueden confundirse con el

hongo antagonista. Las temperaturas altas, de más de 30 °C, matan las conidias del hongo, bajando su rendimiento, y por lo tanto no son eficientes al momento de su aplicación.

Por lo tanto el producto debe ser conservado a medio ambiente en un lugar limpio, fresco y sombreado. Pudiendo permanecer hasta por un mes a 20 – 25 °C y hasta por tres meses a 16 °C , después de recibidos.

## **PROCEDIMIENTO PARA LA APLICACIÓN DE HONGOS ANTAGONISTAS**

### **Aplicaciones foliares:**

DOSIS: 1 - 2 k por 200 litros de agua.

1. Preparar el agua para aplicar el hongo antagonista. Medir la dureza y acidez del agua, si los valores sobrepasan a 150 ppm y pH 7 respectivamente utilizar ablandadores para disminuir la dureza y por consiguiente el pH. Si se emplea agua cuya dureza es menor a 150 ppm , entonces, usar un corrector de acidez .
2. Colocar 100 ml de aceite de aceite agrícola vegetal, en cada una de las bolsas y agregar 1 litro de agua
3. Frotar con la mano para desprender las esporas de arroz.
4. Verter el agua en un recipiente (balde) con la ayuda de un colador.
5. Nuevamente colocar medio litro de agua en la bolsa y verter.
6. Una vez mas agregar medio litro de agua en la bolsa y verter. Repetir este proceso hasta separar por completo las esporas de arroz. Aproximadamente con 4 litros de agua, se logra separar las esporas del arroz. A esta solución podemos llamarle caldo de antagonistas para fines prácticos.
7. Colocar los 4 litros de caldo de antagonista en una botella o balde y dejarlo a temperatura ambiente, en un lugar sombreado por un periodo de 6 horas como mínimo hasta 16 horas como máximo, tiempo suficiente para hidratar las esporas secas de los hongos.
8. Repetir ítem 2 hasta ítem 7 para cada una de las bolsas.
9. Agitar la mezcla y verterla en el cilindro.
10. Llenar el equipo de aspersión y seguir agitando cada vez que se repita esta acción.
11. Dirigir la aspersión mojando bien la planta.
12. El arroz que queda después del lavado, echarlo debajo de las plantas, debido a que aún conservan esporas adheridas, servirán para eliminar enfermedades radiculares.
13. En casos de no contar con cilindros de 200 litros se sugiere las siguientes unidades por mochilas:
  - En Mochilas de 15 litros, primero agregar 300 mililitros del caldo preparado y completar con agua los 15 litros.
  - En Mochilas de 20 litros, primero agregar 400 mililitros del caldo preparado y complementar con agua los 20 litros.

### **Tratamiento de plántulas para el transplante:**

Dosis : 1 kilo en 40 litros de agua

1. Vaciar el contenido de la bolsa en un balde, agregar 40 litros de agua



2. Agregar 40 ml de adherente o aceite agrícola vegetal
3. Obtenido el preparado, lavar el *Trichoderma* durante 10 minutos.
4. Luego sumergir las plántulas durante 10 minutos.
5. Sembrar después del tratamiento.

#### **Tratamiento de semilla:**

El empleo de *Trichoderma* para el tratamiento de semillas es probablemente la forma mas económica y rápida para introducir el biocontrol en un área determinada, el método consiste en tratar las semillas con una suspensión acuosa de esporas mas un adherente. Así la semilla recibe una cubierta protectora cuyo efecto se muestra cuando la semilla es plantada en el sustrato correspondiente. El hongo *Trichoderma* es capaz de colonizar la superficie de la raíz y la rizósfera a partir de la semilla tratada.

Dosis : 1 kilo por 50 k de semilla

1. Humedecer la semilla (la semilla debe estar húmeda para que el hongo pueda impregnarse)
2. Poner la semilla en un recipiente y agregar el hongo moviendo bien para impregnarla
3. Dejar orear
4. Sembrar

#### **Siembra en almaciguera:**

Dosis: 1 k en 1 metro cúbico de materia orgánica

1. Distribuir el contenido de la bolsa en la materia orgánica previamente humedecida
2. Incorporar a la almaciguera
3. Nivelar, cubriendo el *Trichoderma* y regar
4. Esperar 2 - 3 días para sembrar

#### **Aplicación al cuello de planta:**

1. En vivero, preparar el hongo igual que para aplicaciones foliares y aplicar al cuello de planta mojando bien
2. En campo definitivo aplicar a través del riego por goteo.

### **PRECAUCIONES QUE SE DEBEN TENER EN CUENTA PARA EL USO DE HONGOS ANTAGONISTAS**

Aunque los hongos antagonistas son inocuos a los hombres, animales y plantas, para su preparación y aplicación se deben tener ciertas precauciones:

- Preparar la solución bajo sombra, nunca a pleno sol.
- Usar guantes y mascarilla para realizar el lavado del arroz
- Usar guantes y mascarilla para las aplicaciones
- Evitar todo contacto innecesario con el producto, no ingerirlo ni inhalarlo
- No fumar o comer durante su manipuleo.
- Lavarse y cambiar de ropa después del trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. Cambridge 218p.

Cate, R. J. 1990. Biological control of pest and diseases: Integrating a diverse heritage. In new directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pest and diseases. Ralph R. Baker and Peter E. Dunn, Edts. Alan R, Liss, Inc. New York. p, 9.

Cook, J.R. & Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota. APS Press 539 p.

De Paz, L; M. Mendez. 1997. *Trichoderma* sp. Agente biocontrolador de hongos fitopatógenos. Tesis de grado. Universidad Nacional autónoma d México, p. 28 – 35.

Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. Manejo Integrado de Plagas N° 62 pp . 96 – 100. Costa Rica

Fravel, Deborah, 1998. Commercial Biocontrol Products for Use against Soilborne Crop Diseases. Web site: <http://www.barc.usda.gov/psi/bpdl/bpdlprod/bioprod.html>

Melgarejo, P., De Cal, A., et M. Sagasta, E. 1989. Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stomata by *Monilinia laxa* in culture. Can. J. Bot. 67:83-87.

Larone, D. H.: Medically Important Fungi: A Guide to Identification, 3rd. ed., AS Press, Washington, 1995.

Paez, O; G. Bernaza: M. Acosta. 2006. Uso agrícola de *Trichoderma*.

Soberanis, W.; A. Zapata, E. Torres, W Montes, H. Gómez. 2006. Nueva Tecnología de producción de hongos benéficos. Resumen XIX Congres Peruano de Fitopatología, Cajamarca Perú

Stefanova, M. Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. Como antagonistas de hongos fitopatógenos. Web site: <http://codagea.edoags.gob.mix/produce/TRICHODE.Htm>

Singh, J. L. 198. antagonism and biological control. In biocontrol of plant diseases. K. G. Mukerji and K. L. Garg, Edts. CRC press- Boca Raton, Florida (2): 168 – 175.

Ulhoa, C.J. 1996. Enzimas micolíticas produzidas pelo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum*. p.234-238 en V sincobiol Simposio de controle biológico. Anais: conferencias y palestras.Foz de Iguaçu-Parana-Brasil.

Vero Mendes, S. ; P. Mondino. 1999. Control biológico postcosecha en Uruguay. Horticultura International. Año 7 N° 26