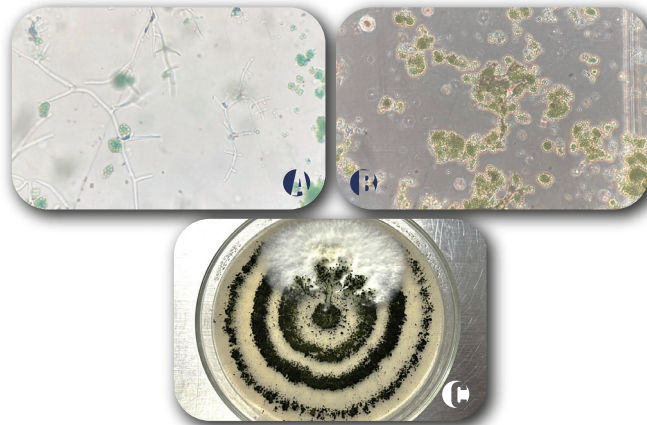


ANTECEDENTES

La reducción del uso de fungicidas sintéticos, ha impulsado el desarrollo de tecnologías sostenibles basadas en microorganismos benéficos, como alternativa para una producción eficiente y de alta calidad. En este contexto, *Trichoderma* spp. es un hongo benéfico con estructuras características (A,B) utilizado en el control biológico de fitopatógenos, así como para el fortalecimiento de los cultivos. Particularmente *Trichoderma asperellum* ha sido ampliamente estudiado por su relevancia en la agricultura como biocontrolador de enfermedades en cultivos de importancia económica; actuando mediante tres mecanismos principales: la antibiosis, donde produce metabolitos secundarios que inhiben el desarrollo de patógenos, alterando la permeabilidad de su membrana lipídica el micoparasitismo (C), mediante el cual se adhiere y enrolla sobre las hifas del patógeno, secretando enzimas líticas que degradan su pared celular hasta la desintegración y su acción bioestimulante, que incrementa la biomasa, el área foliar y la longitud radicular; además, de mejorar la absorción.



BENEFICIOS

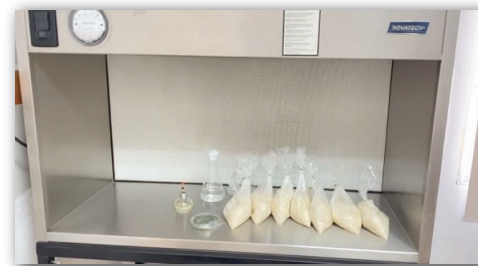
- Ayuda al control de patógenos
- Activa la resistencia sistémica inducida (ISR) en plantas
- Estimula el crecimiento radicular
- Incrementa la absorción de nutrientes
- Mejora la salud del suelo
- Es compatible con el manejo orgánico
- Reduce el uso de fungicidas químicos

MATERIALES Y EQUIPOS

Laboratorio de Fitopatología - DPV, EEP
28±3°C · 61±5% HR · Portoviejo, Manabí

INSUMOS Y MATERIALES

- Cepa pura de *T. asperellum*
- Arroz de tercera calidad
- Agua destilada
- Papa - Dextrosa - Agar
- Hipoclorito de sodio
- Alcohol etílico 96%
- Autoclave (121°C, 15 psi)
- Cámara de flujo laminar
- Balanza analítica
- Estufa
- Microscopio
- Mechero de Bunsen
- Asa de siembra
- Caja Petri
- Matraz
- Vaso de precipitación
- Algodón



MEDIO DE CULTIVO

La elaboración del medio de cultivo PDA se realiza en laboratorio, mediante la cocción de 250 g de papa en 1000 mL de agua destilada, durante 45 minutos en placa calefactora (A), seguido de filtración para separar el extracto líquido. Al filtrado obtenido se adicionan 30 g de agar y 15 g de dextrosa (B). Posteriormente, la preparación se distribuye en alícuotas de 500 mL en matraces Erlenmeyer de 1000 mL, los cuales son sellados y sometidos a esterilización en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 25 minutos.



PRODUCCIÓN DE *Trichoderma asperellum*

1

DESINFECCIÓN DEL LABORATORIO Y MATERIALES A UTILIZAR EN LA PRODUCCIÓN DE *T. asperellum*

La desinfección es una etapa fundamental para reducir la carga microbiana en superficies, equipos y utensilios. Este procedimiento permite prevenir la contaminación cruzada y mantener condiciones asépticas durante el proceso de producción, garantizando la pureza y calidad del producto final.

2

SIEMBRA EN CAJAS PETRI

Una vez esterilizado el medio PDA, se deja enfriar hasta aproximadamente 45°C y se vierte en cajas Petri, distribuyendo 20 mL por caja. Tras la solidificación del medio, se inocula *T. asperellum* con asa esteril dentro de la cámara de flujo laminar, a partir de la cepa pura conservada por 4 días en laboratorio.

3

CONSERVACIÓN DE LA CEPA

Se siembra una porción superficial de micelio de *T. asperellum* en tubos de ensayo con medio PDA. Este procedimiento garantiza la pureza, conservación y disponibilidad de la cepa para futuros trabajos de investigación y producción.

4

INOCULACIÓN EN SUSTRATO DE ARROZ

Para la multiplicación de *T. asperellum* en sustrato sólido, se esterilizan cuatro porciones de 250 g de arroz con 150 mL de agua destilada en fundas de polifán a 121 °C durante 30 minutos en autoclave. Una vez frío el sustrato precocido, se cosechan los conidios de una caja petri con cuatro días de crecimiento, raspando suavemente con una asa estéril en cámara de flujo laminar; los cuales se suspenden en 80 mL de agua destilada estéril y se distribuyen 20 mL por funda, sellándolas herméticamente para prevenir contaminación externa.

5

INCUBACIÓN Y SECADO

Las fundas inoculadas se incuban a 28±3°C y 61±5% de HR, realizando masajes suaves al sustrato a los tres y seis días, con la finalidad de favorecer la distribución y colonización del hongo. Transcurridos ocho días, el material colonizado se coloca en bandejas plásticas para su secado y posterior almacenamiento, garantizando la conservación del inóculo.

6

ALMACENAMIENTO

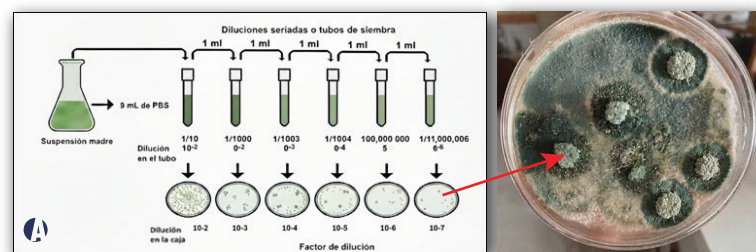
Una vez seco el inóculo, se almacena durante tres meses en fundas de polifán herméticamente selladas y conservadas a temperatura ambiente, en un lugar fresco y seco, alejado de la luz directa, con la finalidad de preservar la viabilidad y concentración de conidios de *T. asperellum* para su posterior uso en campo.

CONTROL DE PUREZA (DILUCIONES SERIADAS)

1 Para el efecto, se transfiere 1 g de sustrato colonizado a un vaso de precipitación con 10 mL de agua destilada estéril y Tween 80 al 0,1% como agente surfactante, agitando durante 30 minutos para obtener la solución madre con los conidios en suspensión homogénea.

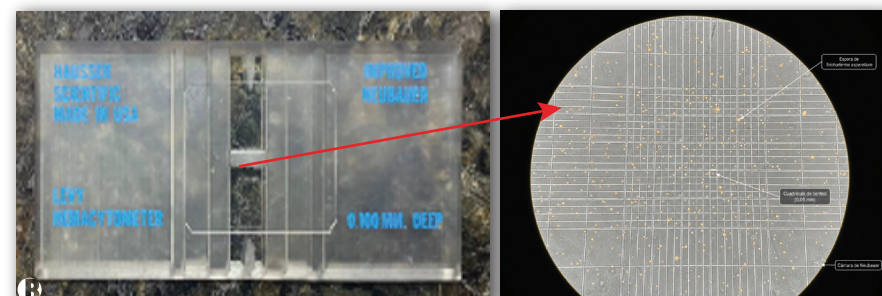
2 A partir de la solución madre, se realizan diluciones seriadas decimales transfiriendo 1 mL a tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, repitiendo el proceso de manera sucesiva hasta alcanzar una dilución de 10^{-6} (A).

3 De las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se toman alícuotas de 1 mL, las cuales se inoculan en cajas Petri con medio PDA y se incuban durante cinco días para confirmar la pureza del cultivo.



CONTEO DE CONIDIOS EN LA CÁMARA DE NEUBAUER CON OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

Para el conteo de esporas se utiliza la cámara de Neubauer, empleando una suspensión de 10^{-3} . Se coloca una alícuota de la muestra en la cámara y se procede a contar las esporas presentes en los cuadrantes correspondientes bajo el microscopio, evitando el doble conteo de aquellas ubicadas sobre las líneas límite (B).



AUTORES

¹Jennifer Jahaira, López Anchundia, Mg.
¹Ernesto Gonzalo, Cañarte Bermúdez, Ph.D.
¹José Bernardo, Navarrete Cedeño, M.Sc.
²Jordan Gilmer, Bailón Pachay Mg.
³Silvia Lorena, Montero Cedeño, Ph.D.
⁴Jefferson Bertin, Vélez Olmedo, Ph.D.

¹INIAP, Estación Experimental Portoviejo
²Gobierno Provincial de Manabí
³Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí-MFL
⁴Universidad Técnica de Manabí



GOBIERNO DEL ECUADOR

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

ISBN: 978-9942-773-74-6



f @iniapec i @iniapecuador X @iniapecuador
 www.iniap.gob.ec

Estación Experimental Portoviejo

Departamento de Protección Vegetal

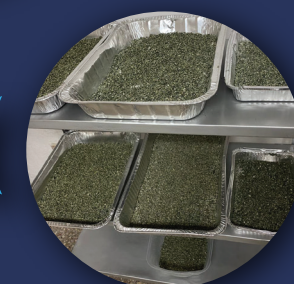


Arroz precocido

Arroz inoculado



Almacenamiento



Secado en bandeja

Protocolo para la Producción de *Trichoderma asperellum* en laboratorio



GOBIERNO DEL ECUADOR

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias