

PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma harzianum* Rifai EN DIFERENTES SUSTRATOS ORGÁNICOS

A. C. Michel-Aceves¹; M. A. Otero-Sánchez¹;
R. D. Martínez-Rojero¹; N. L. Rodríguez-Morán¹;
R. Ariza-Flores²; A. Barrios-Ayala²

¹Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero,
Av. Vicente Guerrero No. 81, Colonia Centro. Iguala, Guerrero. C. P. 40000. MÉXICO.
Correo-e: amichelaceves@yahoo.com.mx (¹Autor responsable).

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Guerrero),
Campo Experimental Chilpancingo. Av. Ruffo Figueroa S/N,
Colonia Burócratas, Chilpancingo, Guerrero. C. P. 39090. MÉXICO.

RESUMEN

Uno de los sustratos utilizados para reproducir a *Trichoderma* spp., es el grano entero de arroz, el cual tiene costo relativamente alto. Con el propósito de encontrar un sustrato orgánico, económico y de fácil adquisición en la región, en el cual este hongo tenga un buen desarrollo y una alta producción de esporas viables, se estableció esta investigación que tuvo como objetivos evaluar 15 sustratos orgánicos en la reproducción masiva y viabilidad de esporas de *T. harzianum* y asociarlo con la composición nutrimental de los sustratos. Se evaluaron cáscaras de tomate (cáliz maduro acrescente de la flor, que encierra al fruto); arroz (glumas, lemas y palea de la flor); ajo (catáfilas coriáceas); cacao (testa de la semilla); ajonjolí (pericarpio del fruto); cacahuate (pericarpio del fruto); café (pericarpio del fruto); vaina de frijol (pericarpio del fruto); olote de maíz (raquis de la inflorescencia femenina); granos de arroz, sorgo, alpiste y maíz; rastrojo de soya y maíz. Se utilizó un diseño completamente al azar, con ocho repeticiones. Se cuantificó el número y porcentaje de viabilidad de las esporas y se correlacionó con el análisis químico proximal. El olote fue el mejor sustrato, tanto en la producción como en la germinación de esporas de *T. harzianum* con 4.43×10^8 ml⁻¹ y 99.0 % de viabilidad, respectivamente. Con base en el análisis químico proximal, el desarrollo del micelio, esporulación y viabilidad de las esporas, *T. harzianum* tiene una buena producción en aquellos sustratos orgánicos que tienen alto porcentaje de humedad, bajo contenido de minerales, proteína y grasa, y un porcentaje intermedio de fibra.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: reproducción masiva, olote, análisis químico proximal, agente de control biológico.

PRODUCCIÓN MASIVA DE *Trichoderma harzianum* Rifai EN DIFERENTES SUSTRATOS ORGÁNICOS

ABSTRACT

One of the substrates used to reproduce *Trichoderma* spp., it is the rice grain of, which has relatively high cost. With the purpose of finding an organic, economic and available substrate in the region, in the one which this fungus has a good development and a high production of viable spores, this investigation has as objectives to evaluate 15 organic substrates in the massive reproduction and viability of spores from *T. harzianum*, and to associate it with the nutrimental composition of the evaluated substrate. Husk tomato (flower calyx); rice (flower glumes, lemma and palea); garlic (coriaceous cataphyllary); cocoa (seed coat); sesame (fruit pericarp); peanut (fruit pericarp); coffee (fruit pericarp); bean sheath (fruit pericarp); corn cob (feminine inflorescence rachis); grains of rice, sorghum, bird seed and corn; soybean and corn stubble were evaluated. A randomized complete block design with eight replications design was used. It was quantified the number and viability percentage of the spores and it was correlated with the proximal chemical analysis. The corn cob is the best substrate as much in the production as in the spores germination of *T. harzianum* with 4.43×10^8 ml⁻¹ and 99.0 % of viability. In base with the proximal chemical analysis, the mycelium development, esporulated and spores viability, *T. harzianum* has a good production in those organic substrates that have high humidity percentage, low content of minerals, protein and fat, and an intermediate fiber percentage.

ADDITIONAL KEY WORDS: massive reproduction, corn cob, chemical proximal analysis, biological control agent.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las enfermedades de plantas generalmente se controlan con fungicidas químicos, los cuales se aplican al suelo, semillas, follaje y fruto. Las consecuencias negativas sobre la salud, la contaminación del ambiente, la residualidad y el desarrollo de resistencia, ha generado la búsqueda de alternativas de reemplazo con la incorporación de agentes biológicos. El control biológico (CB) utiliza organismos vivos; involucra también microorganismos cuya actividad biológica disminuye el daño causado por los patógenos de las plantas (Herrera-Estrella y Chet, 1998). Debido a este antagonismo se logra reducir o eliminar la incidencia del fitopatógeno. Independientemente de su actividad, un agente de biocontrol eficaz debe tener la capacidad de sobrevivir en el hábitat donde es aplicado.

El género *Trichoderma* es un hongo cosmopolita, habitante natural del suelo y algunas de sus especies tienen la habilidad de producir enzimas que atacan o inhiben a hongos fitopatógenos y que lo hacen un excelente agente de biocontrol (Michel-Aceves *et al.*, 2001). Gran parte del potencial de este hongo radica en el hecho de que presenta un amplio espectro de antagonismo con la capacidad de controlar muchos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium* y *Phytophthora* entre otros, que afectan muchos cultivos de interés comercial como maíz, cebolla, tomate, frijol, trigo, etc. (Chet *et al.*, 1998).

La necesidad de reducir el uso de fungicidas en el control fitosanitario hace necesario desarrollar tecnologías que permitan de forma fácil, económica y efectiva obtener productos a partir de microorganismos, con la calidad y cantidad suficiente para su aplicación masiva en las áreas de cultivo. *Trichoderma* spp., se desarrolla bajo diferentes condiciones ambientales y de nutrientes; para su producción

masiva en condiciones *in vitro* tiene la capacidad de cultivarse sobre diferentes sustratos de bajo costo (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Los hongos antagonistas poseen características que definen muy bien sus posibilidades como biocontroladores, por su alto poder patogénico y capacidad de producir epífitas; sin embargo, su producción a escala comercial e industrial presenta algunos inconvenientes como el desconocimiento de sustratos alternativos eficientes, infraestructura y equipo mínimo necesario; situación que ha limitado su desarrollo y utilización a mayor escala. Existen diferentes métodos para reproducir a *Trichoderma*; sin embargo, tienen un costo elevado. Uno de los sustratos más utilizados es el grano entero de arroz, el cual tiene un costo relativamente alto, por lo cual se pretende incorporar el uso de sustratos regionales para su reproducción (Fernández-Larrea, 2004).

Con base en la problemática presentada, la finalidad de esta investigación es encontrar un sustrato económico y de fácil adquisición, en el cual *Trichoderma* tenga un buen desarrollo y una elevada producción de esporas viables. Se establecieron los siguientes objetivos: a) Evaluar 15 sustratos orgánicos en la reproducción masiva de *T. harzianum*. b) Seleccionar el mejor sustrato en el que se obtenga la mayor cantidad de esporas. c) Medir la viabilidad de las esporas en cada uno de los sustratos y d) Determinar mediante un análisis químico proximal, la composición nutrimental de los sustratos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la cepa Thzcf-12, la cual pertenece al cepario del laboratorio de Control Biológico de la Universidad de Colima y Fitopatología del CSAEGRO. Se evaluaron 15 sustratos (Cuadro 1). La cantidad utilizada de cada uno de los sustratos fue variable porque se consideró el mismo

CUADRO 1. Descripción de los tratamientos (sustratos orgánicos) y cantidad utilizada.

Núm.	Tratamiento	Descripción botánica	Cantidad (g)
1	Cáscara de tomate picada	Cáliz acrescente de flor que encierra al fruto de <i>Physalis ixocarpa</i> Brot. Ex Hornem.	100
2	Cáscara de arroz	Glumas, lemas y palea de la flor de <i>Oryza sativa</i> L.	100
3	Cáscara de ajo picada	Catafilas coriáceas de <i>Allium sativum</i> L.	150
4	Cáscara de cacao	Testa de la semilla de <i>Theobroma cacao</i> L.	200
5	Cáscara de ajonjolí picada	Pericarpio del fruto <i>Sesamum indicum</i> L.	100
6	Olote de maíz picado	Raquis de la inflorescencia femenina de <i>Zea mays</i> L.	150
7	Grano de arroz	Fruto de <i>Oryza sativa</i> L.	300
8	Grano de sorgo	Fruto de <i>Sorghum bicolor</i> L. (Moench).	300
9	Grano de alpiste	Fruto de <i>Phalaris canariensis</i> L.	300
10	Grano quebrado de maíz	Fruto de <i>Zea mays</i> L.	300
11	Cáscara de cacahuete picada	Pericarpio del fruto de <i>Arachis hypogaea</i> L.	100
12	Rastrojo de soya picado	Tallo y hojas de <i>Glycine max</i> (L.) Merrill.	100
13	Rastrojo de maíz picado	Tallo y hojas de <i>Zea mays</i> L.	80
14	Vaina de frijol picada	Pericarpio del fruto de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	150
15	Cáscara de café	Pericarpio del fruto de <i>Coffea arabica</i> L.	130

volumen; todos cubrían una tercera parte del volumen de la bolsa de poliestireno de 25 cm de ancho por 34 cm de largo. Los 15 tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar, con ocho repeticiones. La unidad experimental estuvo formada por una bolsa de poliestireno con el sustrato. Se contabilizó el número de esporas por mililitro.

Todos los sustratos se lavaron con agua de la llave para quitarles el polvo, se escurrió el exceso de agua, para posteriormente agregar agua destilada y el antibiótico cloranfenicol a 500 ppm, hasta quedar sumergidos en su totalidad; se dejó reposar por 45 min. Después se escurrió el agua con el antibiótico y se llenaron bolsas con las cantidades antes indicadas, amarrándose en la parte superior con una liga, para su posterior esterilización en el autoclave durante 30 minutos a 15 libras de presión (Michel-Aceves *et al.*, 2005b).

El sustrato estéril una vez frío se inoculó en condiciones asépticas, agregando 5 ml de una suspensión de esporas de *Trichoderma harzianum* (Thzcf-12) a una concentración de 1×10^8 . Los sustratos inoculados se incubaron por un periodo de 21 días a 25 ± 2 °C, suministrándoles aire dentro de la cámara de aislamiento cada cinco días, para un buen crecimiento y esporulación del hongo. Para la obtención de esporas se agregó inicialmente 250 ml de agua destilada estéril a cada bolsa con la finalidad de separar el mayor número de esporas, finalmente se aforó a 300 ml para cada tratamiento.

La concentración de esporas de cada suspensión obtenida se realizó con la ayuda de una cámara hematimétrica de Neubauer (Lumycite, Propper, Manufac-

turing Co. Inc. Long Island, NY). El conteo en la cámara se realizó cuatro veces para cada tratamiento y repetición.

Para determinar la viabilidad de las esporas, en cajas Petri de 9.0 cm de diámetro con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se sembraron 100 esporas, a partir de una suspensión de 1×10^3 se utilizó 0.1 ml por caja. A las 48 horas posteriores a la siembra se contabilizó el número de unidades formadoras de colonias (ufc) germinadas. Los 15 tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones.

Para la determinación de materia seca, humedad, cenizas, extracto etéreo, fibra cruda y proteína cruda, del análisis químico proximal, se siguieron los métodos oficiales de análisis químicos (A.O.A.C., 1980). Los 15 sustratos se molieron con la ayuda de un molino utilizando malla No. 20; posteriormente se utilizó 1 y 2 g, dependiendo del sustrato y del análisis a realizar.

A los resultados obtenidos de todas las variables se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico SAS (SAS, Institute, Inc. 1988), de acuerdo con el diseño completamente al azar; también se realizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$) y un análisis de correlación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número de esporas por mililitro

El análisis de varianza mostró efectos estadísticos altamente significativos entre los sustratos evaluados ($P \leq 0.0001$); el rango de producción fue muy heterogéneo, varió desde 0.25 a 4.43×10^8 esporas ml^{-1} para los sustratos

CUADRO 2. Número y viabilidad de esporas de *Trichoderma harzianum* en los sustratos evaluados.

Núm.	Tratamiento (Simbología)		Número de esporas $\times 10^8 \text{ ml}^{-1}$	Porcentaje de Viabilidad
6	Olote de maíz picado	OMP	4.43 a ^z	99.0 a ^z
7	Grano de arroz	GAR	3.13 b	97.5 ab
9	Grano de alpiste	GAL	2.31 c	94.3 abc
11	Cáscara de cacahuate picada	CCA	1.98 d	93.8 abcd
8	Grano de sorgo	GSO	1.72 e	94.8 abc
2	Cáscara de arroz	CAR	1.47 f	97.0 ab
13	Rastrojo de maíz picado	RMP	1.40 g	93.0 abcd
12	Rastrojo de soya picado	RSP	1.12 h	94.0 abcd
3	Cáscara de ajo picada	CAO	1.12 h	87.8 d
5	Cáscara de ajonjolí picada	CAJ	1.11 h	95.5 abc
1	Cáscara de tomate picada	CTO	0.73 i	92.5 bcd
15	Cáscara de café	CCE	0.57 j	91.8 bcd
4	Cáscara de cacao	CCO	0.42 k	89.3 cd
14	Vaina de frijón picada	VFR	0.25 l	92.5 bcd
10	Grano quebrado de maíz	GQM	0.25 l	90.3 cd

^zMedias por columnas seguidas con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey $P \leq 0.5$.

maíz quebrado y olote, respectivamente (Cuadro 2). Las esporas (conidios) de *Trichoderma* spp. son unicelulares de forma globosa a subglobosa o elipsoidal, de 5 µm de largo y ancho (Michel-Aceves *et al.*, 2001). Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Gutiérrez-Ochoa *et al.*, citados por Michel-Aceves *et al.* (2005b), quienes reportan 9.68×10^8 y 6.28×10^8 esporas ml⁻¹, al utilizar como sustrato cempasúchil *Tagetes erecta* L. y guamúchil *Pithecolobium dulce* (Roxb.) Benth., respectivamente. Por su parte Michel-Aceves *et al.* (2005b), con el sustrato que tradicionalmente se utiliza en la reproducción masiva de hongos entomopatógenos (grano entero de arroz) obtuvo 4.01×10^8 esporas ml⁻¹, el cual es superado ligeramente por el olote en esta investigación, a pesar de utilizar 150 g, lo cual puede deberse a la mayor superficie de contacto. *Trichoderma* spp., es un hongo muy versátil, de fácil manipulación (Fernández-Larrea, 2001), que presenta la versatilidad de cultivarse y desarrollarse sobre muchos y diferentes sustratos (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Es importante considerar la concentración de esporas que se aplica en el control biológico de fitopatógenos; entre mayor sean, los resultados son mejores. Generalmente en trabajos de invernadero y campo se utiliza al menos una concentración de 1×10^8 esporas ml⁻¹ (Cooney *et al.*, 1997). La mayoría de los sustratos evaluados en la presente investigación alcanzó esta concentración; sin embargo, tanto el arroz y el alpiste, a pesar de ser eficientes en la producción de esporas, son sustratos con un elevado valor económico en el mercado, por lo cual no se recomendaría su compra para estos fines, sobre todo existiendo sustratos regionales más económicos, considerando que se busca reducir los costos en la producción de esporas. Se corrobora lo indicado por Hjeljord y Tronsmo (1998), en el sentido de que *Trichoderma* spp., para su producción masiva en condiciones *in*

vitro presenta facilidad de cultivarse sobre diferentes sustratos de bajo costo.

Porcentaje de viabilidad

Existen efectos altamente significativos entre los tratamientos evaluados ($P \leq 0.0001$). Los rangos del porcentaje de viabilidad son muy homogéneos, ya que la diferencia entre el mayor y el menor fue de 11.2 %; el sustrato que tiene una excelente germinación es el olote con un 99.0 %, seguido por el grano de arroz (97.5 %) y cáscara de arroz (97.0 %) mientras que las catáfilas de ajo es el sustrato con el menor porcentaje (87.8 %) de viabilidad (Cuadro 2).

Es importante mencionar que en todos los tratamientos el porcentaje de viabilidad es alto, lo que significa que en ningún sustrato se generan sustancias que afecten negativamente la germinación de las esporas, a pesar de su aroma fuerte como es el caso de la catáfila de ajo y cáscara de café por presencia de metabolitos secundarios volátiles como la alicina en el ajo y ácido fórmico y/o acético, entre otros, en el café. Esta situación se debe considerar al seleccionar al sustrato molido que se utiliza en la reproducción masiva (Fernández-Larrea, 2004). Existen sustancias que pueden tener los sustratos que pudieran tener efecto sobre las esporas. Tal es el caso del efecto de las enzimas quitinasas y glucanasas producidas por *Trichoderma* que tienen acción negativa sobre la viabilidad de esporas al reducir la germinación hasta un 73.9 % de *Fusarium oxysporum* (Michel-Aceves *et al.*, 2005a), mientras que en los resultados de la presente investigación las esporas de *Trichoderma* germinaron satisfactoriamente de 87.8 a 99.0 %, lo que indica que los compuestos que tienen los diferentes sustratos no influyen negativamente en la viabilidad de las esporas producidas.

CUADRO 3. Análisis químico proximal de los sustratos evaluados, expresados en porcentaje.

Núm.	Tratamiento	M. Seca	Humedad	Cenizas	P. Cruda	Grasa	F. Cruda
1	CTO	91.08 de ^z	8.92 g	8.52 g	11.84 f	15.94 b	41.78 c
2	CAR	99.89 a	0.11 j	22.22 a	3.70 n	0.75 k	44.96 b
3	CAO	87.51 i	12.49 a	15.62 c	6.91 k	3.99 g	25.78 j
4	CCO	90.26 f	9.74 e	7.51 j	25.20 b	47.86 a	20.72 k
5	CAJ	90.05 f	9.95 d	7.48 j	8.84 j	4.16 fg	34.17 h
6	OMP	91.94 c	8.06 h	2.18 n	2.86 o	2.49 ij	35.74 e
7	GAR	87.44 i	12.56 a	3.66 l	11.51 g	0.82 k	3.50 m
8	GSO	88.82 h	11.18 b	5.76 k	10.07 h	2.38 j	1.60 o
9	GAL	90.86 e	9.14 f	13.48 d	27.92 a	5.0 e	7.11 l
10	GQM	88.84 h	11.16 b	3.16 m	13.72 e	2.64 hi	2.62 n
11	CCA	91.13 d	8.87 g	7.97 i	6.14 l	2.27 j	76.06 a
12	RSP	89.59 g	10.41 c	8.17 h	19.44 c	8.61 c	33.13 h
13	RMP	92.54 b	7.46 i	9.49 f	4.92 m	5.5 d	28.60 i
14	VFR	88.86 h	11.14 b	10.49 e	9.43 i	4.30 f	40.52 d
15	CCE	87.46 i	12.54 a	19.22 b	16.52 d	2.74 h	35.36 f

^zMedias por columnas seguidas con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey $P \leq 0.5$.

Análisis Químico Proximal

EIAANOVA realizado para cada componente del análisis químico proximal detectó diferencias altamente significativas ($P \leq 0.0001$) en todos los casos. Se hará mención del sustrato que mayor producción de esporas obtuvo y su correlación con el contenido nutricional de cada material utilizado como sustrato.

Los rangos de materia seca y humedad son muy heterogéneos (Cuadro 3); el rango entre el mayor y el menor porcentaje de humedad es de 12.45 %. El sustrato con la menor cantidad de materia seca y mayor humedad fue el grano de arroz (87.44 y 12.56 %, respectivamente); mientras que la cáscara de arroz fue la de mayor materia seca y menor humedad (99.89 y 0.11 %, respectivamente).

En el olote se obtuvo significativamente mayor producción de esporas y presentó 91.94 % de humedad y 8.06 % de materia seca. Con base en estos resultados, *Trichoderma harzianum* prefiere sustratos que contengan entre 7.0 y 11.5 % de humedad para su buen desarrollo y producción de esporas. No se manifestó correlación significativa en estas dos variables con el número de esporas por mililitro producidas; sin embargo, sí existe correlación positiva entre el porcentaje de viabilidad y materia seca, y negativa con humedad (Cuadro 4), por lo que un exceso de humedad en el sustrato repercute negativamente en la germinación de esporas.

En general, la mayoría de los hongos requieren de humedad para la germinación de esporas, pero los excesos son perjudiciales (Agosin y Aguilera, 1998). La mayoría de las especies de *Trichoderma* son fotosensitivas, esporulan rápida y abundantemente en muchos sustratos naturales o

artificiales sobre los cuales forman anillos concéntricos de esporas en respuesta a la alternancia de luz y oscuridad, con bajos requerimientos de humedad, características inherentes a las especies agrupadas en esta categoría (Papavizas, 1995).

Los porcentajes obtenidos de humedad para cáscara de cacahuete, alpiste y sorgo son superiores a los indicados por Crampton y Harris (1979) y Church y Pond (1997) quienes reportan de 5.3-7.7, 8.7, y 11.0%, respectivamente; y son inferiores para el rastrojo de maíz con 17.6 % de humedad. En este sentido, Fuentes *et al.*, 2001 realizaron un análisis químico *in vitro* del rastrojo de maíz y los valores obtenidos para la materia seca, humedad y proteína cruda son similares a los reportados en la presente investigación.

El contenido de cenizas representa la cantidad de minerales que contiene un sustrato o alimento (Tejada, 1992). Existe una diferencia entre el mayor y menor contenido de 20.04 %; la cáscara de arroz tiene la mayor cantidad de cenizas con 22.22 % y el olote la menor con 2.18 % (Cuadro 3). Como el olote fue el mejor sustrato en la producción de esporas y el de menor contenido de ceniza o minerales, se pone de manifiesto que este hongo no es exigente en su nutrición, ya que con un mínimo de nutrientes se desarrolla y forma esporas satisfactoriamente. Esta tendencia se corrobora con la correlación negativa en la producción de esporas; concuerda con lo consignado por Fernández-Larrea (2001), en el sentido de que *Trichoderma* spp., se desarrolla bien en muchos sustratos y no exige muchos nutrientes.

Los valores que se obtienen en esta investigación son altos comparados con los contenidos de cenizas que reporta Crampton y Harris (1979) y Church y Pond (1997) quienes mencionan de 4.3 a 7.0 % en cáscara de cacahuete, 6.6 %

CUADRO 4. Análisis de correlación del número y viabilidad de esporas de *Trichoderma* spp., con el contenido nutricional de los sustratos evaluados

Trat.	M. Seca	Humedad	Cenizas	P. Cruda	Grasa	F. Cruda	N. esporas	Viabilidad
M. Seca	1.00000	-0.99950**	0.39024**	-0.32402*	-0.03183 ^{NS}	-0.37668**	0.14931 ^{NS}	0.32861*
		<0.0001	0.0021	0.0115	0.8092	0.0030	0.2548	0.0104
Humedad		1.00000	-0.38809**	0.31989*	0.03056 ^{NS}	-0.37839**	-0.14866 ^{NS}	-0.33238**
			0.0022	0.0127	0.8167	0.0029	0.2570	0.0095
Cenizas			1.00000	0.02218	-0.12125	0.28306*	-0.32571*	-0.15893 ^{NS}
				0.8664 ^{NS}	0.3561 ^{NS}	0.0284	0.0111	0.2252
P. Cruda				1.00000	0.53726**	-0.41948**	-0.28142*	-0.27251*
					<0.0001	0.0008	0.0294	0.0352
Grasa					1.00000	-0.05832 ^{NS}	-0.33844**	-0.35505**
						0.6581	0.0082	0.0054
F. Cruda						1.00000	-0.04445 ^{NS}	0.06425 ^{NS}
							0.7359	0.6258
N. esporas							1.00000	0.60427**
								<0.0001
Viabilidad								1.00000

^{NS} = No significativo. * = Significativo a una $P \leq 0.05$ ** = Significativo a una $P \leq 0.01$

en alpiste, 1.7 % en sorgo y 5.5 % en el rastrojo de maíz. Asimismo, Fuentes *et al.*, (2001), reportan 6.83 % de cenizas para el rastrojo de maíz. Las diferencias pueden explicarse en función de las diferencias propias de cada genotipo utilizado y el método de siembra (Rivera y Taborda, 1997).

El Alpiste presenta el mayor contenido de proteína cruda (27.92 %), mientras que el olote el menor valor (2.86 %); el rango entre ambos es de 25.06 %. Considerando que el olote fue el mejor sustrato en la producción de esporas y el de menor contenido de proteína cruda, se pone nuevamente de manifiesto que este hongo no es exigente en su nutrición, ya que con un mínimo de nutrientes crece y se desarrolla satisfactoriamente produciendo muchas esporas (Fernandez-Larrea, 2001). La correlación negativa en el número y viabilidad de esporas nos confirma esta tendencia.

Los porcentajes de proteína cruda obtenidos para la cáscara de cacahuete (6.14 %), rastrojo de maíz (4.92 %) y sorgo (10.07 %) son bajos y en el caso del alpiste altos (27.92 %) al compararse con los valores 6.8 - 7.7; 7.3, 11.0 y 8% respectivamente, reportados por Crampton y Harris (1979) y Church y Pond (1997). La variación de estos datos puede deberse a que las variedades con las que se comparan son diferentes a las utilizadas en este trabajo y las reportadas por los autores antes citados. En este sentido, Rivera y Taborda (1997) compararon cuatro progenies del cultivar local de sorgo Criollo Blanco Alto en rendimiento de materia verde, materia seca y proteína cruda sembrado a dos distancias entre hileras (0.60 y 0.80 m). Los resultados reportan una variación no significativa desde 11.16 a 12.08 %, por lo que tanto el genotipo utilizado como la densidad de siembra, entre otros factores influyen en variación de los porcentajes.

Con base en los resultados obtenidos de cenizas y proteína cruda que son bajos para el olote (2.18 y 2.86 %, respectivamente) y sabiendo que fue el mejor productor de esporas, nuevamente se confirma lo expresado por Fernández-Larrea (2001), quien reporta que *Trichoderma* spp., es un hongo muy versátil de fácil manipulación, que tiene la capacidad de adaptarse a condiciones microambientales y se desarrolla en muchos sustratos orgánicos.

Con relación al contenido de grasa, los valores varían desde 47.86 % en la cáscara de cacao y 0.75 % de la cáscara de arroz. Se observa una diferencia de 47.11 % entre el valor de grasa mayor y el menor. El olote fue el mejor sustrato en la producción de esporas y que contiene valores bajos de grasa (2.49 %); nuevamente se pone de manifiesto que este hongo no es exigente en su nutrición, ya que con un mínimo de ellos crece satisfactoriamente, produciendo muchas esporas (Fernández-Larrea, 2001). La correlación negativa indica que a mayor contenido de grasa es menor la cantidad y viabilidad de las esporas producidas.

Con base en los porcentajes indicados por Crampton y Harris (1979) y Church y Pond (1997), los contenidos de grasa que obtuvimos son altos para la cáscara de cacahuete (2.27 %), alpiste (5.0 %) y rastrojo de maíz (5.5 %), mientras que para el sorgo son bajos (2.28 %). Los porcentajes para los sustratos según estos autores son: 1.3, 2, 2 y 2.8 % respectivamente. Esta variación en los resultados se puede explicar en función de las diferencias propias de cada variedad utilizada y el método de siembra entre otros factores que influyen en los porcentajes (Rivera y Taborda, 1997).

La cáscara de cacahuete es el sustrato que tuvo el mayor porcentaje de fibra cruda (76.06 %), mientras que el sorgo el menor valor (1.60 %); la diferencia entre ambos es de 74.46 %. El olote fue el mejor sustrato en la producción de esporas y tiene un porcentaje intermedio de fibra (36.74 %); no existe una tendencia definida de este hongo sobre este factor, ya que con un mínimo de nutrientes crece y se desarrolla bien, que es lo que busca la reproducción masiva (Agosin y Aguilera, 1998). No se registró correlación con el número y viabilidad de esporas.

Los valores de fibra cruda que muestran Crampton y Harris (1979) y Church y Pond (1997) para la cáscara de cacahuete y rastrojo de maíz son bajos, ellos obtuvieron datos de 54 a 60.4 y 21.3 % respectivamente; sin embargo, para el alpiste son altos (31.3 %) con respecto a los obtenidos en esta investigación. La variación de los resultados puede deberse a los genotipos que se utilizaron y al método de siembra entre otros factores (Rivera y Taborda, 1997).

En general, los resultados obtenidos corroboran que la producción masiva de *Trichoderma* spp., en condiciones *in vitro* presenta la facilidad de cultivarse sobre diferentes sustratos orgánicos de bajo costo (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

CONCLUSIONES

De los 15 sustratos evaluados, el olote obtuvo mejores resultados en la producción y viabilidad de esporas de *T. harzianum* con $4.43 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ y 99.0 %, respectivamente. Con base en el análisis químico proximal, el desarrollo del micelio, esporulación y viabilidad de las esporas de *T. harzianum* es óptimo con sustratos orgánicos con un alto porcentaje de humedad (8.06), bajo contenido de minerales (2.18), proteína (2.86) y grasa (2.49), y un porcentaje intermedio de fibra (35.74).

LITERATURA CITADA

- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists) 1980. Official methods of analysis of association of official agricultural chemist. Morwits, W. (Editor) 13th ed. Washington, D. C. 978 p.
- AGOSIN, E.; AGUILERA, J. M. 1998. Industrial production of active propagules of *Trichoderma* for agricultural uses. pp. 205-

228. In: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Eds.). Tylor & Francis. Inc. Bristol, PA. USA.
- CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. pp. 153–169. In: *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2. HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Eds.). Tylor & Francis. Inc. Bristol, PA. USA.
- CHURCH, D. C.; POND, W. G. 1997. Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 462 p.
- COONEY, J. M.; LAUREN, D. R.; JENSEN, D. J.; PERRY–MEYER, L. J. 1997. Effect of solid substrate, liquid supplement, and harvest time on 6–n–pentyl–2h–pyran–2–one (6PAP) production by *Trichoderma* spp. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45: 531–534.
- CRAMPTON, E. W.; HARRIS, L. E. 1979. Nutrición animal aplicada. Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 756 p.
- FERNÁNDEZ-LARREA, V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) 62: 96-100.
- FERNÁNDEZ-LARREA, V. O. 2004. Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad. Laboratorio de Hongos Entomopatógenos. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). La Habana Cuba. 10 p.
- FUENTES, J.; MAGAÑA, C.; SUAREZ, L.; PEÑA, R., RODRÍGUEZ, S.; ORTIZ de la R. B. 2001. Análisis químico y digestibilidad *in Vitro* del rastrojo de maíz (*Zea mays* L. *Agronomía Mesoamericana* 12(2): 189-192.
- HERRERA–ESTRELLA, A.; CHET, I. 1998. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. pp. 263–283. In: *Agricultural Biotechnology*. ALTMAN, A. (Ed.). Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
- HJELJORD, L.; TRONSMO, A. 1998. *Trichoderma and Gliocladium* in biological control: an overview. pp. 153-169. In: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Eds.), Tylor & Francis. Inc. Bristol, PA. USA.
- MICHEL-ACEVES, A. C.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; OCHOA-MORENO, M. E.; MESINA-ESCAMILLA, J. C.; y SAMUELS, G. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por “Escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(2): 154-160.
- MICHEL-ACEVES, A. C.; OTERO-SÁNCHEZ, M. A.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; ARIZA-FLORES, R.; BARRIOS-AYALA, A. 2005a. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum in vitro*. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 11(12): 273-278.
- MICHEL-ACEVES, A. C.; REYES-DE LA CRUZ, A.; OTERO-SÁNCHEZ, M. A.; REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O. y LEZAMA-GUTIÉRREZ, R. 2005b. Potencial Antagónico de *Trichoderma* Pers.:Fr. spp., sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Snyder y Hansen) y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* e Invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(3): 284-291.
- PAPAVIZAS, G. C. 1985. *Trichoderma and Gliocladium* : Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-54.
- RIVERA, S. J. C.; TABORDA, F. 1997. Rendimiento de materia verde, materia seca y proteína cruda del cultivar local Criollo Blanco Alto (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 14: 433-438.
- SAS, INSTITUTE, INC. 1988. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute Incorporation. Cary, NC, USA. 1028 p.
- TEJADA, H. I. 1992. Control de calidad y análisis de alimentos para animales. Sistema de educación continua, A. C. México, D. F. 397 p. pp. 263–283.