



RESEARCH ARTICLE

New cadmium bioremediation agents: *Trichoderma* species native to the rhizosphere of cacao trees

Nuevos agentes de biorremediación de cadmio: Especies de *Trichoderma* nativas de la rizósfera de árboles de cacao

José Cayotopa-Torres^{1,2,*} ; Luis Arévalo-López^{1,2} ; Roger Pichis-García¹ ; Delmar Olivera-Cayotopa¹ ; Marilyn Rimachi-Valle¹ ; Kadir Márquez-Dávila² 

¹ Laboratorio de Fitopatología, Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Jr. Belén Torres de Tello N° 135, Morales, San Martín. Peru.

² Grupo de investigación en Bioprotección Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional Hermilio Valdizán, Huánuco. Peru.

* Corresponding author: cayotopatorres@gmail.com (J. Cayotopa-Torres).

Received: 2 October 2020. Accepted: 29 March 2021. Published: 28 April 2021.

Abstract

The cadmium absorption by cacao plant and increased in beans accumulation, represents a problem for the exports of cacao beans and chocolate industry. In this study, native strains of *Trichoderma* spp. were evaluated for their capacity of tolerate and removal to Cd, collected from rhizospheric soil of cacao trees. In order to evaluate such capacities under *in vitro* conditions, 10 native strains of *Trichoderma* spp. were inoculated in potato dextrose agar (PDA) culture medium contaminated with three concentrations of Cd (25 ppm, 100 ppm and 250 ppm) and in potato dextrose (PD) culture medium contaminated with 5 ppm Cd. With data of growth rhythm (RC) of the fungus colony in Cd presence and percentage of Cd removal (RCd), the analysis of variance was performed, and the means were compared with Scott-knott test ($p = 0.05$). The results showed that, *Trichoderma* spp. were sensitive to Cd presence and capable of Cd removing. Among the strains with high significant removal Cd capacity ($p < 0.05$) were *T. brevicompactum* M43D (83.1%), *T. harzianum* M1P (67.0%) and *T. spirale* M55SM (65.8%). While the most tolerant strains were *T. harzianum* M1P and *T. koningiopsis* M3B, in comparison to the control treatment without Cd. Therefore, *T. brevicompactum* M43D and *T. spirale* M55SM unite to the list of *Trichoderma* species as potential new Cd bioremediation agents that can be explored.

Keywords: *Theobroma cacao*; native strains; heavy metal; soil fungi.

Resumen

La absorción de cadmio (Cd) por la planta de cacao y la mayor acumulación en granos, representa un problema para las exportaciones y la industria chocolatera. En este estudio, se evaluaron cepas de *Trichoderma* spp. nativas con capacidad de remoción y tolerancia a Cd, colectadas del suelo rizosférico de árboles de cacao. Para evaluar tales capacidades en condiciones *in vitro*, fueron inoculadas 10 cepas *Trichoderma* spp. nativas en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) contaminado con tres concentraciones de Cd (25 ppm, 100 ppm y 250 ppm) y en medio de cultivo papa dextrosa (PD) contaminado con 5 ppm de Cd. Con los datos de ritmo de crecimiento (RC) de la colonia del hongo en presencia de Cd y porcentaje de remoción de Cd (RCd), se realizaron el análisis de varianza y las medias se compararon con la prueba de Scott-knott ($p = 0,05$). Los resultados mostraron que *Trichoderma* spp. fueron sensibles a la presencia de Cd y capaces de remover Cd. Entre las cepas con alta capacidad de remoción significativa ($p < 0,05$) de Cd fueron *T. brevicompactum* M43D (83,1%), *T. harzianum* M1P (67,0%) y *T. spirale* M55SM (65,8%). Mientras, las cepas más tolerantes fueron *T. harzianum* M1P y *T. koningiopsis* M3B, en comparación al tratamiento control sin Cd. Por lo tanto, *T. brevicompactum* M43D y *T. spirale* M55SM se suman a la lista de especies de *Trichoderma* como nuevos agentes potenciales de biorremediación de Cd que pueden ser explorados.

Palabras clave: *Theobroma cacao*; cepas nativas; metales pesados; hongos de suelo.

DOI: <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.017>

Cite this article:

Cayotopa-Torres, J., Arévalo-López, L., Pichis-García, R., Olivera-Cayotopa, D., Rimachi-Valle, M., & Márquez-Dávila, K. (2021). Nuevos agentes de biorremediación de cadmio: Especies de *Trichoderma* nativas de la rizósfera de árboles de cacao. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 155-160.

1. Introducción

Los granos de cacao son fuente de materia prima para la elaboración del chocolate, uno de los commodities agrícola con mayor incremento en consumo de los últimos años. La demanda en cantidad y calidad ha sostenido un aumento en el precio de la almendra fermentada y seca (Intriago et al., 2019; Lara et al., 2016), sin embargo, los requerimientos de calidad son muy altos y demandantes. Uno de los parámetros más importantes de calidad es la concentración de contaminantes y metales pesados, particularmente el cadmio (Cd), que en el caso del cacao parecen ser por naturaleza más altos que con otros cultivos (Llatance et al., 2018; Lara et al., 2016). La Unión Europea, principal destino de las exportaciones de cacao en grano del Perú, ha fijado los límites máximos de Cd en cacao y chocolate en un rango de 0,10 a 0,80 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Meter et al., 2019). El Cd es el metal pesado con más atención porque se transfiere y se acumula en el cuerpo afectando nuestra salud, además de su extremado bajo valor tolerable, que está en el rango de 0,2 - 0,5 ppm para los alimentos terminados, como el caso de granos de cacao (Meter et al., 2019; Arévalo-Gardini et al., 2017; Lara et al., 2016). Arévalo-Gardini et al. (2017) reportó que árboles de cacao en Perú muestran acumulación de Cd tanto en hojas como en granos y representa un problema para las exportaciones de granos de cacao y la industria chocolatera (Assa et al., 2018; Arévalo-Gardini et al., 2017). La presencia de altos niveles de Cd en el cacao cultivado principalmente en las regiones de Amazonas, Piura y Tumbes es una preocupación para los cacaoteros (Arévalo-Gardini et al., 2017). El incumplimiento del reglamento de la Unión Europea está generando consecuencias económicas y sociales importantes para los productores cacaoteros de Perú y países vecinos.

Los microorganismos del suelo constituyen una alternativa amigable para minimizar la absorción de Cd por la planta de cacao desde el suelo. Hongos, bacterias y levaduras habitantes del suelo pueden absorber los metales pesados, ellos utilizan los contaminantes como fuente de nutrientes y energía, convirtiendo en sustancias solubles (Qiu-Yun et al., 2016; Svecova et al., 2006; Xiezi et al., 2005). Los microorganismos inmovilizan iones metálicos mediante su unión con sus paredes celulares (Vankar et al., 2008; Akhtar et al., 1996), como el caso del hongo *Trichoderma* que puede absorber Cd (Qiu-Yun et al., 2016; Dugal & Gangawane, 2012). Las especies de *Trichoderma* se encuentran comúnmente en todos los tipos de suelos y son ampliamente estudiados como agentes antagonistas de fitopatógenos, sin embargo, solo *Trichoderma virens*, *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. simmonsii*, han sido reportados con capacidad de absorción de iones de Cd con las paredes celulares del hongo y colonizando dominios que contienen metales tóxicos (Yaghoubian et al., 2019; Hoseinzadeh et al., 2017; Mohsenzadeh & Shahrokhi, 2014; Dixit et al., 2011; Fomina et al., 2003). Las especies mencionadas de *Trichoderma* y otras pueden explotarse como agentes de biorremediación de campos agrícolas contaminados con Cd, bajo diversas condiciones de pH (Nongmaithem et al., 2016; Vankar & Bajpai, 2008; Fomina et al., 2003). Los estudios son limitados sobre el uso de *Trichoderma*

spp. nativas como agentes biológicos para el manejo de Cd en plantaciones de cacao.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue analizar las especies de *Trichoderma* nativas del suelo rizosférico de árboles de cacao, con capacidad de remoción y tolerancia a Cd y su potencial uso como agentes de biorremediación.

2. Materiales y métodos

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana, en Perú (6° 35' 28" S, 76° 18' 47" W; altitud 330 msnm). Para aislar *Trichoderma* spp. nativas se colectó suelo rizosférico de árboles de cacao, en parcelas de diez provincias de la región San Martín, Perú (Tabla 1). Las muestras fueron tomadas al azar, haciendo un recorrido en zigzag. De cada muestra se tomó 5 g de suelo y se colocaron en matraces estériles con 95 ml de agua destilada estéril. Se agitaron los matraces con las muestras a 120 rpm durante 30 min y de cada matraz con la muestra se procedió a realizar diluciones seriadas. De la dilución 10^{-5} se extrajo 1 ml y se inoculó en placas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) + 0,5 g de oxitetraciclina L^{-1} . Las placas fueron incubadas a 25 °C en oscuridad hasta observar el crecimiento de las colonias de *Trichoderma* (48 -72 horas), posteriormente se sometió a luz artificial para estimular la esporulación de los hongos. Las colonias emergentes se subcultivaron y purificaron individualmente. Los aislamientos de *Trichoderma* spp. se cultivaron en placas de Petri con medio de cultivo PDA DifcoTM, a 25 °C durante 5 días (Márquez-Dávila et al., 2020). Se logró aislar un total de 56 cepas de *Trichoderma* spp., de estas se eligió diez cepas (una cepa representante por provincia) para el estudio de tolerancia y remoción de Cd (Figura 1).

La tolerancia a Cd y capacidad de remoción de 10 cepas de *Trichoderma*, fue estudiada mediante el ritmo de crecimiento (RC) de las colonias y su efecto de remoción, en condiciones *in vitro* en medio de cultivo contaminado con Cd.

Para evaluar el RC de las cepas de *Trichoderma* spp., se preparó PDA DifcoTM con tres concentraciones de Cd (25 ppm, 100 ppm y 250 ppm), a partir de una solución concentrada de 5000 ppm de Cd (Mohsenzadeh & Shahrokhi, 2014). El medio de cultivo PDA + Cd fue ajustado a pH neutro y agitado para homogenizar al contaminante. Posteriormente fue esterilizado en autoclave vertical durante 25 minutos a 121 °C y 15 libras de presión. El medio de cultivo contaminado estéril fue distribuido a placas de Petri de 80 x 15 mm en condiciones asépticas dentro de la cabina de flujo laminar. Se consideró cinco placas por cepa del hongo para cada concentración de Cd y como testigo PDA sin Cd. La siembra de *Trichoderma* spp., fue mediante un disco de 5 mm de PDA con micelio del hongo. Después de 48 h de incubación en oscuridad a 25 °C, se registró la medida del diámetro de la colonia y con ese dato se calculó el RC, dividiendo el diámetro total de la colonia con el tiempo (Nongmaithem et al., 2016; French & Hebert, 1980). El ensayo *in vitro* para medir el RC fue repetida dos veces.

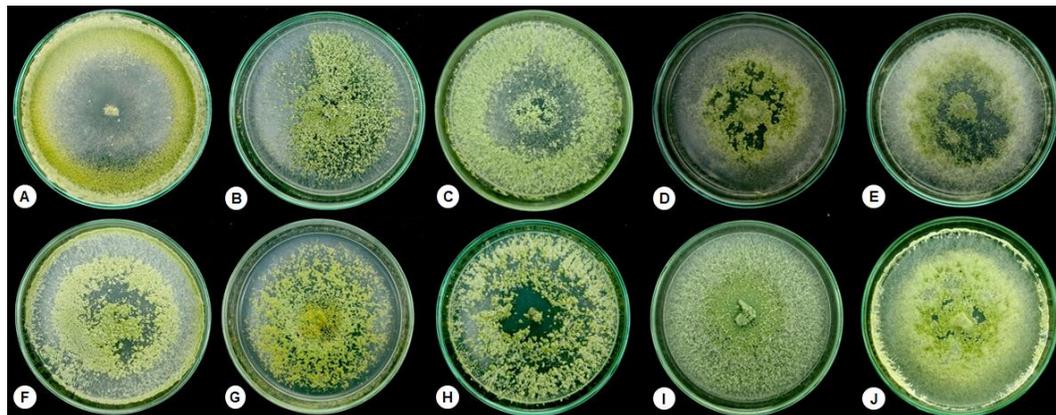


Figura 1. Colonias de las especies de *Trichoderma* nativas en medio de cultivo PDA a los 8 días de incubación. A) *T. harzianum* M1P, B) *T. koningiopsis* M3B, C) *T. harzianum* M17MC, D) *T. spirale* M19T, E) *T. spirale* M25AM, F) *T. koningiopsis* M33L, G) *T. virens* M40H, H) *T. brevicompactum* M43D, I) *Trichoderma* sp. M52BR y J) *T. spirale* M55SM.

La remoción de Cd por *Trichoderma* spp., fue evaluada siguiendo la metodología adaptada de **Mohsenzadeh & Shahrokhi (2014)** y **Hoseinzadeh et al. (2017)**. Se preparó el medio de cultivo líquido papa dextrosa (PD); 250 g de papa cocida en un recipiente con 1 L de agua destilada durante 20 min, el caldo fue colado en un frasco de vidrio graduado, al caldo se agregó 20 g de dextrosa agitando constantemente. El medio PD fue distribuido a 33 matraces (200 ml por matraz), cada matraz fue contaminado con 5 ppm de Cd. Los matraces con medio contaminado fueron esterilizados en autoclave vertical durante 20 minutos a 121 °C y 15 libras de presión. Cada matraz fue inoculado con cuatro discos de 5 mm de agar con el micelio de *Trichoderma* spp. (tres matraces por cepa) más tres matraces control sin *Trichoderma*, posteriormente se sometió a incubación en agitación a 150 rpm durante 15 días y a temperatura ambiente del laboratorio 25 °C (± 2). Después de la incubación, el micelio fue separado del medio de cultivo por filtrado en algodón estéril dentro de la cabina flujo laminar. Los filtrados fueron sometidos a digestión húmeda en ácido nítrico a 130 °C por 5 h (**Güldas, 2008**), la solución digerida se filtró a través de un papel filtro Whatman N° 42 y se diluyó antes del análisis. La concentración final de Cd en el filtrado se determinó usando un espectrofotómetro de absorción atómica (SAA; modelo Varian "Spectra 55B" Hecho en Australia). Para lograr la calidad analítica, se llevaron a cabo tres repeticiones para cada muestra (**Arévalo-Gardini et al., 2017**). Con la concentración inicial en PD y concentración final de Cd en el filtrado, se calculó el porcentaje de remoción (RCd) por las cepas de *Trichoderma* spp. (**Hoseinzadeh et al., 2017; Mohsenzadeh & Shahrokhi, 2014**), según la fórmula siguiente: $R = [(Po - Pe)/Po] * 100$; donde R = porcentaje de Cd removido por *Trichoderma*; Po = concentración inicial de Cd en medio de cultivo (ppm) y Pe = concentración final del Cd en medio de cultivo (ppm).

Todos los datos se registraron en una base de Excel. Antes del análisis de varianza, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk ($\alpha 0,05$) para confirmar la normalidad de los datos. Los datos de RC fueron normales y en el caso de los datos porcentuales, los datos originales se transformaron a $\log(x + 2)$ según lo recomendado por **Sheskin (2011)**. Las

medias se compararon con la prueba de Scott-knott a un nivel de significancia de 0,05 utilizando el software estadístico R estudio, versión 2015 (**R Core Team, 2015**).

Tabla 1
Procedencia de las especies de *Trichoderma* nativas evaluadas

<i>Trichoderma</i> spp.	Cepa	Procedencia
<i>T. harzianum</i>	M1P	Picota, San Martín - Perú
<i>T. koningiopsis</i>	M3B	Bellavista, San Martín - Perú
<i>T. harzianum</i>	M17MC	Mariscal Cáceres, San Martín - Perú
<i>T. spirale</i>	M19T	Tocache, San Martín - Perú
<i>T. spirale</i>	M25AM	Moyobamba, San Martín - Perú
<i>T. koningiopsis</i>	M33L	Lamas, San Martín - Perú
<i>T. virens</i>	M40H	Huallaga, San Martín - Perú
<i>T. brevicompactum</i>	M43D	El Dorado, San Martín - Perú
<i>Trichoderma</i> sp.	M52BR	Rioja, San Martín - Perú
<i>T. spirale</i>	M55SM	San Martín, San Martín - Perú

3. Resultados y discusión

Las cepas de *Trichoderma* estudiadas, fueron previamente identificadas mediante marcadores moleculares, según el análisis de secuencias nucleotídicas de las regiones 1 y 2 del espaciador transcrito interno ITS del ADN ribosómico. La secuencia de cada cepa tuvo 99% de similitud, comparada con secuencias depositadas en la base de datos del Genbak (NCBI) (**Druzhinina et al., 2005**). Los resultados *in vitro* del efecto de tres concentraciones de Cd (25 ppm, 100 ppm y 250 ppm), sobre el RC como parámetro de tolerancia, muestran sensibilidad de *Trichoderma* spp. a la presencia de Cd (**Figura 2**). El incremento de concentración de Cd en placas Petri con PDA reduce significativamente el RC de *Trichoderma* spp. (25 ppm = 17 , 100 ppm = 42% y 250 ppm = 61%), comprado con el control sin Cd.

La tolerancia de *Trichoderma* spp. a la presencia a Cd disminuye con el incremento de la concentración (hasta 61% a 250 ppm). **Hoseinzadeh et al. (2017)** reporta que *Trichoderma* es sensible a la presencia de Cd, puede tolerar y sobrevivir a una concentración máxima, y dos especies lograron sobrevivir a 200 mg/L de Cd. La tolerancia de cepas de *Trichoderma* spp. a la presencia de

Cd, es un indicador de la influencia sobre la absorción del metal desde el suelo por las plantas de cacao (Meter et al., 2019) y puede desarrollarse como agentes tolerantes al estrés por Cd (Mohsenzadeh & Shahrokhi, 2014). La tolerancia de *Trichoderma* a un rango de concentraciones de metales pesados fueron estudiadas mediante pruebas *in vitro*, demostrando que cepas nativas o mutantes de *Trichoderma* tienen el potencial de tolerar el estrés por metales pesados (Kredics et al., 2001a, 2001b). Otro estudio observó menor concentración de Cd, mayor biomasa vegetal y un aumento significativo en la clorofila en plantas de arroz tratada con *Trichoderma* sp. cepa MT-4 (Nongmaithem et al., 2017).

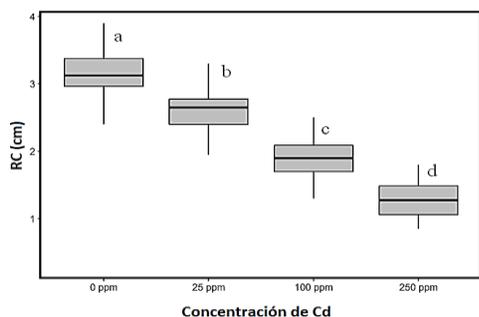


Figura 2. Efecto de concentraciones de cadmio (0, 25, 100 y 250 ppm) sobre el ritmo de crecimiento de *Trichoderma* spp. en medio de cultivo PDA. Las cajas con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observaron los efectos significativos de las concentraciones de Cd sobre la tolerancia por las especies de *Trichoderma* (Figura 3). En ausencia de Cd,

observamos dos grupos y una cepa diferente según el RC. Primer grupo de crecimiento rápido formados por *T. harzianum* M1P, *T. koningiopsis* M3B y *Trichoderma* sp M52BR. Segundo grupo de crecimiento intermedio formados por *T. harzianum* M17MC, *T. koningiopsis* M33L, *T. virens* M40H y *T. spirale* cepas M19T, M25AM y M55SM, y de crecimiento lento solo *T. brevicompactum* M43D.

La tolerancia a Cd por las especies de *Trichoderma* mostró variabilidad con el incremento de la concentración. Con 25 ppm de Cd, observamos dos grupos, el primero de mayor tolerancia (*T. harzianum* M17MC, *T. spirale* M19T y *T. koningiopsis* M33L) y el segundo por cepas de menor tolerancia. Con 100 ppm de Cd, observamos tres grupos, el primero por cepas de tolerancia alta (*T. harzianum* M1P, *T. koningiopsis* M3B, *T. harzianum* M17MC, *T. spirale* M25AM, *T. koningiopsis* M33L y *Trichoderma* sp. M52BR), segundo de tolerancia media (*T. virens* M40H y *T. spirale* cepas M19T y M55SM); y tercero de tolerancia baja (*T. brevicompactum* M43D). Mientras con 250 ppm de Cd, las cepas de tolerancia alta fueron *T. harzianum* M1P, *T. koningiopsis* M3B, *T. koningiopsis* M33L y *Trichoderma* sp. M52BR; de tolerancia media *T. spirale* (M19T y M25AM), y *T. virens* M40H; y de tolerancia baja *T. harzianum* M17MC, *T. brevicompactum* M43D y *T. spirale* M55SM.

En general *T. harzianum* M1P y *T. koningiopsis* M3B tuvieron alta tolerancia a Cd (RC = 2,54 cm y 2,45 cm, respectivamente). Mientras con tolerancia media fueron *T. harzianum* M17MC, *T. koningiopsis* M33L y *Trichoderma* sp. M52BR (RC entre 2,39 cm y 2,33 cm); y de tolerancia baja *T. virens* M40H, *T. spirale* cepas M19T, M25AM y M55SM (RC entre 2,25 cm y 2,03 cm); sin embargo, observamos tolerancia muy baja de *T. brevicompactum* M43D (Figura 4).

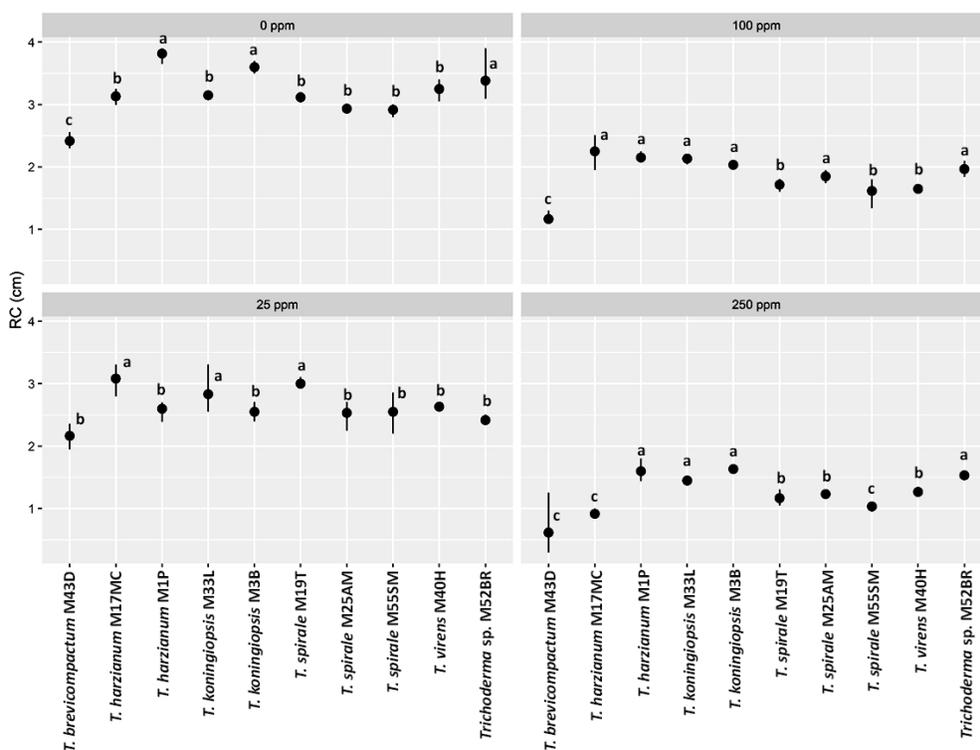


Figura 3. Efecto de concentraciones de Cd en la tolerancia de cepas de *Trichoderma* spp. Los puntos en las líneas con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las cepas de *Trichoderma* spp.

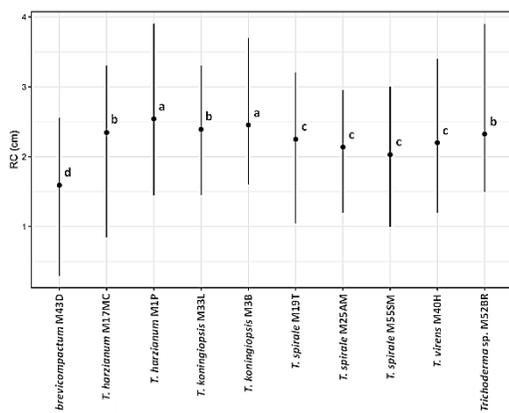


Figura 4. Tolerancia de *Trichoderma* spp a cadmio. Los puntos en las líneas con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados muestran una notable capacidad de remoción de Cd por las cepas *Trichoderma* spp. alcanzando valores de 31,8% a 83,1% comparado con el control medio PD contaminado con Cd sin *Trichoderma* (Figura 5). Observamos dos grupos cepas de *Trichoderma* spp según la capacidad de remoción de Cd del medio PD. El primer grupo identificado, corresponde a cepas con porcentajes más altos de remoción de Cd *in vitro*; *T. brevicompactum* M43D (83,1%), *T. harzianum* M1P (67,0%) y *T. spirale* M55SM (65,8%), estas cepas se constituyen en potenciales candidatos para remoción de Cd. El segundo grupo corresponden a cepas con menores porcentajes de remoción de Cd; *T. koningiopsis* M3B (49,1%), *T. koningiopsis* M33L (43,6%), *T. virens* M40H (39,2%), *T. harzianum* M17MC (35,4%), *Trichoderma* sp M52BR (32,7%), *T. spirale* M25AM (32,3%) y *T. spirale* M19T (31,8%). Los resultados obtenidos revelan a tres especies de *Trichoderma* (*T. brevicompactum*, *T. harzianum* y *T. spirale*), como potenciales agentes de biorremediación de Cd y sería el primer reporte para *T. brevicompactum* M43D y *T. spirale* M55-SM con capacidad de remoción Cd. En este estudio *T. brevicompactum* M43D alcanzó hasta 83,1% de capacidad de remoción de Cd de medio contaminado, superando a *T. asperellum* reportados por **Mohsenzadeh & Shahrokhi (2014)** y **Hoseinzadeh et al. (2017)** que, bajo condiciones similares de estudio logró absorber Cd hasta 76,17%. Otro estudio reporta a *T. brevicompactum* QYCD-6 como un hongo intestinal de lombrices de tierra con capacidad de eliminar metales pesados de lugares contaminados, el mecanismo como elimina el metal aún se desconoce (**Zhang et al., 2020**). *T. spirale* M55SM con 65,8% de remoción de Cd del medio contaminado, este sería, también el primer reporte para la especie. *T. spirale* es un hongo con actividad de biocontrol en lechuga contra *Corynespora cassiicola* y *Curvularia aeria* causantes de manchas foliares (**Baiyee et al., 2019**). También observamos que *T. harzianum* M1P removió el Cd hasta 67,0%, al respecto **Hoseinzadeh et al. (2017)** concluyeron que *T. harzianum* pueden sobrevivir a concentraciones máximas de Cd (200 mg/L) y eliminarlo absorbiendo Cd del medio de cultivo con las paredes celulares del hongo durante el período de crecimiento. El análisis del transcriptoma de *T. harzianum* en presencia

de Cd realizado por **Oshiquiri et al. (2020)**, revelan varios genes que codifican NmrA y su papel en la respuesta de cadmio; represión del metabolismo de carbohidratos, especialmente los genes relacionados con el micoparasitismo; y sugieren que la capacidad micoparasitaria de *T. harzianum* podría verse afectada durante la exposición al Cd.

Este estudio también revela que *T. koningiopsis*, *T. virens* y *Trichoderma* sp con potencial de remoción de Cd, pero en menor proporción. Un estudio relaciona a *T. koningiopsis* con solubilización de fósforo mediante el empleo diferentes mecanismos en condiciones *in vitro* (**Tandon et al., 2020**). Otro estudio relaciona con la resistencia sistémica inducida (ISR) y promoción de crecimiento de plantas de tomate (**Simbaqueba et al., 2011**). Para el caso de *T. virens* los estudios lo relacionan con el control biológico de enfermedades de plantas, sin embargo, **Frank & Tánová (1993)** observó que Cd induce mutación sobre el crecimiento y la morfología, cuando dejó crecer al hongo en medio de cultivo contaminado con 10 mM de Cd⁺⁺, resultando dos mutantes blancos (no formaron conidióforos) y un mutante amarillo (conidios de diferentes colores y tasa de crecimiento más lenta). **Dixit et al. (2011)** concluye que plantas de tabaco transgénicas que expresan un GST de *T. virens* son más tolerantes al Cd, sin aumentar su acumulación en la biomasa vegetal. Esta es otra evidencia que *T. virens* involucra procesos de mutación.

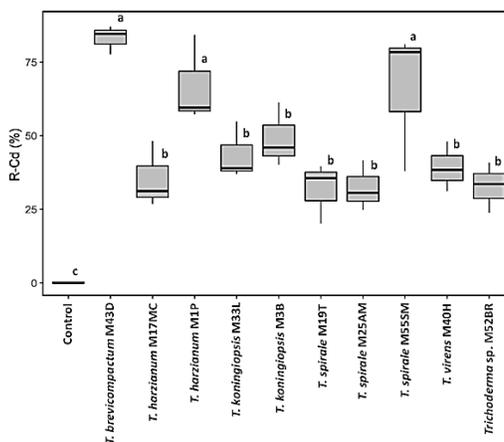


Figura 5. Remoción de Cd por *Trichoderma* spp. nativas *in vitro*. Las cajas con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4. Conclusiones

Las especies de *Trichoderma* evaluadas fueron sensibles a la presencia de Cd, dependientes de la concentración y capaces de remover Cd. Los resultados obtenidos *in vitro* revelan a *T. brevicompactum* M43D (83,1%), *T. harzianum* M1P (67,0%) y *T. spirale* M55SM (65,8%), con alta capacidad de remoción de Cd. Mientras a *T. harzianum* M1P y *T. koningiopsis* M3B como los más tolerantes. *T. brevicompactum* M43D y *T. spirale* M55SM se suman a la lista de especies de *Trichoderma* como nuevos agentes potenciales de biorremediación de Cd que pueden ser explorados, en nuevos estudios.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Gobierno Regional de San Martín, por el apoyo financiero para desarrollar esta investigación, en el marco del proyecto de inversión pública "Ampliación y mejoramiento de los servicios de apoyo al desarrollo productivo de la cadena del cacao a los productores en la región San Martín", con código de inversión N° 346495.

ORCID

J. Cayotopa  <https://orcid.org/0000-0002-3880-2186>
 L. Arévalo-López  <https://orcid.org/0000-0002-6417-8161>
 R. Pichis  <https://orcid.org/0000-0003-0927-1096>
 D. Olivera  <https://orcid.org/0000-0002-8528-8538>
 M. Rimachi  <https://orcid.org/0000-0001-8743-6912>
 K. Márquez-Dávila  <https://orcid.org/0000-0003-3019-5665>

Referencias bibliográficas

- Akhtar, M., Sastry, K., & Mohan, P. (1996). Mechanism of metal ion biosorption by fungal biomass. *Biometals*, 9, 21–28.
- Arévalo-Gardini, E., Arévalo-Hernández, C. O., Baligar, V. C., Zhenli, L., & He, Z. L. (2017). Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Perú. *Science of The Total Environment*, 605–606, 792–800.
- Assa, A., Noor, A., Yunus, M.R., Misnawi, & Djide, M. N. (2018). Heavy metal concentrations in cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) originating from East Luwu, South Sulawesi, Indonesia. *Journal of Physics: Conference Series*, 979, 012011.
- Baiyee, B., Pornsuriya, C., Ito, S., Sunpapao. (2019). *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aeria*. *Biological Control*, 129, 195–200.
- Dixit, P., Mukherjee, P. K., Ramachandran, V., & Eapen, S. (2011). Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plos one*, 6(1), 16360.
- Druzhinina, I. S., Kopchinsky, A. G., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(10), 813–828.
- Dugal, S., & Gangawane, M. (2012). Metal tolerance and potential of *Penicillium* species for use in mycoremediation. *J Chem Pharm Res*, 4(5), 2362–2366.
- Fomina, M., Ritz, K., & Gadd, G. M. (2003). Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. *Mycological Research*, 107(7), 861–871.
- Frank, V., & Tánová, G. (1993). Mutagenic effect of cadmium on *Trichoderma viride*. *Acta Microbiologica Hungarica*, 40(1), 65–69.
- French, E. R., Hebert, T. T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. Editorial IICA, Costa Rica. 289 pp.
- Güldaş, M. (2008). Comparison of digestion methods and trace elements determination in chocolate with pistachio using absorption spectrometry. *J. Food Nutr. Res.*, 47(2): 92–99.
- Hoseinzadeh, S., Shahabivand, S., & Alliloo, A. A. (2017). Toxic metals accumulation in *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum*. *Microbiology*, 86, 728–736.
- Intriago, F. F., Talledo, S. M., Cuenca, N. G., Macías, B. J., Álvarez, A. J., & Menjivar, F. J. (2019). Evaluación del contenido de metales pesados en almendras de cacao (*Theobroma cacao* L.) durante el proceso de beneficiado. *Pro Sciences: Revista de Producción, Ciencias e Investigación*, 3(26), 17–23.
- Kredics, L., Dóczy, I., Antal, Z., & Manczinger. (2001a). Effect of Heavy Metals on Growth and Extracellular Enzyme Activities of Mycoparasitic *Trichoderma* Strains. *Bull. Environ. Contam. toxicol.*, 66, 249–254.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., & Nagy, E. (2001b). Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains for heavy metal resistance. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 112–116.
- Lara, J., Tejada, C., Villabona, A., Arrieta, A., & Granados, C. C. (2016). Adsorción de plomo y cadmio en sistema continuo de lecho fijo sobre residuos de cacao. *Revista ION*, 29(2), 113–124.
- Llatance, W. O., Gonza, S. C. J., Guzmán, C. W., & Pariante M. E. (2018). Bioacumulación de cadmio en el cacao (*Theobroma cacao*) en la Comunidad Nativa de Pakun, Perú. *Revista Forestal del Perú*, 33(1), 63–75.
- Márquez-Dávila, K., Arévalo-López, L., González, R., Vega, L., & Meza, M. (2020). *Trichoderma* and *Clonostachys* as biocontrol agents against *Meloidogyne incognita* in sachu inchi. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 50, e60890.
- Meter, A., Atkinson, R. J., & Laliberte, B. (2019). *Cadmio en el cacao de América Latina y el Caribe - Análisis de la investigación y soluciones potenciales para la mitigación*. Bioersivity International. Roma, 74 pp.
- Mohsenzadeh, F., & Shahrokhi, F. (2014). Biological removing of Cadmium from contaminated media by fungal biomass of *Trichoderma* species. *J Environ Health Sci Engineer*, 12, 102.
- Nongmaithe, N., Roy, A., & Bhattacharya, P. M. (2017). Potential of *Trichoderma* spp. on Growth Promotion and Mitigating Cadmium Uptake in Rice Plant under the Metal Stress Ecosystem. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 6(6), 992–1010.
- Nongmaithe, N., Roy, A., & Bhattacharya, P. M. (2016). Screening of *Trichoderma* isolates for their potential of biosorption of nickel and cadmium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 305–313.
- Oshiquiri, L. H., dos Santos, K. R. A., Ferreira Junior, S. A., Steindorff, A. S., Barbosa Filho, J. R., Mota, T. M., Ulhoa, C. J., & Georg, R.C. (2020). *Trichoderma harzianum* transcriptome in response to cadmium exposure. *Fungal Genetics and Biology*, 134, 103281.
- Qiu-Yun, J., Feng, Z., Shi-Hui, L., Hai-Di, Z., Dan-Jing, Y., Zhi-Hong, Y., Shao-Shan, L., & Yuan-Xiao, J. (2016). Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils?. *Scientific Reports*, 6, 21805.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Sheskin, D. (2011). *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*. Fifth Edition. Editorial CRC press: Chapman & Hall. New York, USA. 1928 pp.
- Simbaqueba, J., Cotes, A.M., & Barrero, L. E. (2011). Linkage mapping of candidate genes for induce resistance and growth promotion by *Trichoderma koningiopsis* (Th003) in tomato *Solanum lycopersicum*. *Acta Biológica Colombiana*, 16(2), 47–62.
- Svecova, L., Svecova, M., Kubal, M., & Guibal, E. (2006). Cadmium, Lead and Mercury biosorption on waste fungal biomass isolated from fermentation industry. *Separation and Purification Technology*, 52(1), 142–153.
- Tandon, A., Fatima, T., Anshu, Shukla, D., Tripathi, P., Srivastava, S., & Singh, P.C. (2020). Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. *Science*, 32(1), 791–798.
- Yaghoubian, Y., Siadat, S. A., Moradi Telavat, M. R., Pirdashti, H., & Yaghoubian, I. (2019). Bio-removal of cadmium from aqueous solutions by filamentous fungi: *Trichoderma* spp. and *Piriformospora indica*. *Environ Sci Pollut Res*, 26, 7863–7872.
- Vankar, P. S., & Bajpai, D. (2008). Phyto-remediation of Chrome-VI of tannery effluent by *Trichoderma* species. *Desalination*, 222(1–3), 255–262.
- Xiezh, Y., Jieming, C., & Ming, H. M. (2005). Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass. *Soil Biol Biochem*, 37(2), 195–201.
- Zhang, D., Yin, C., Abbas, N., Mao, Z., & Zhang, Y. (2020). Multiple heavy metal tolerance and removal by an earthworm gut fungus *Trichoderma brevicompactum* QYCD-6. *Scientific Reports*, 10, 6940.