

Efecto de extractos de metabolitos de dos aislados nativos *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de brotes juveniles de melina (*Gmelina arborea* Roxb. ex Sm.) bajo condiciones de minitúnel

Luis Fernando Solano-Jiménez¹
Xiomara Mata-Granados²
Olman Murillo-Gamboa³

Resumen

El estudio se ejecutó en dos etapas bajo condiciones de minitúnel. En la primera de ellas, se aplicó extractos de metabolitos y biomasa de dos aislados de *Trichoderma* spp., codificados como MOTrh y LaBioTD37 en forma individual y conjunta con ácido Indolbutírico (hormona enraizante). El análisis de los resultados evidenció que los índices más bajos de mortalidad de los brotes fueron registrados por los tratamientos correspondientes a MOTrh (T2), LaBioTD37 (T3), MOTrh+enraizante (T5), LaBioTD37+enraizante (T6) y MOTrh+LaBioTD37+enraizante (T7). Estos últimos tratamientos (T6 y T7), evidenciaron los porcentajes de enraizamiento más altos (97,5% y 95% respectivamente). La combinación de los aislados con la hormona enraizante (T5, T6, T7) aumentó el número de raíces por brote, mostrando mayor longitud de

Abstract

The study was performed in two stages, both under conditions of minitunnel. In the first, extracts of metabolites and biomass of two isolates of *Trichoderma* spp (LaBioTD37, MOTrh coded) was applied individually and jointly with indole butyric acid (rooting hormone). The analysis of the results showed that the lowest shoot mortality were recorded for treatments corresponding to MOTrh (T2), LaBioTD37 (T3), MOTrh+rooting (T5), LaBioTD37+rooting (T6) and MOTrh+LaBioTD37+rooting (T7). The latter treatments (T6 and T7), showed the highest rooting percentage (97,5% and 95% respectively). Statistically it was determined that the combination of each isolate with rooting hormone (T5, T6, T7) increased the number of roots per shoot, showing greater root length compared with the control. In the second stage, it was determined that the mixture MOTrh+ LaBioTD37 applied to the base of the shoot and inoculated the pellet (T6),

1. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía; Cartago, Costa Rica; luisfdo.solano@gmail.com

2. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía; Cartago, Costa Rica; xmata@itcr.ac.cr

3. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cooperativa de Mejoramiento Genético Forestal (GENFORES); Cartago, Costa Rica; olmuga@yahoo.es

raíz con respecto al testigo. En la segunda etapa, se determinó que la mezcla de MOTrh+LaBioTD37 aplicado a la base del brote e inoculado al pellet (T6), incrementó significativamente la altura en un 37,1%, mientras que la mezcla MOTrh+LaBioTD37 (T5) inoculado a la base del brote aumento la longitud de la raíz en un 75%. La biomasa aérea fresca se incrementó en un 42,5% y 55% por los tratamientos MOTrh+LaBioTD37 inoculado a la base del brote (T5) y MOTrh+LaBioTD37 aplicado a la base del brote e inoculado al pellet (T6), además de incrementar significativamente la biomasa seca aérea en un 58,9%. En cuanto a la biomasa radical, el peso fresco aumentó en 50% y 67% por los tratamientos MOTrh+LaBioTD37 aplicado a la base del brote e inoculado al pellet (T6) y MOTrh+LaBioTD37 inoculado a la base del brote (T5) respectivamente. En términos de peso seco, éste incrementó el 51% y el 68% en los tratamientos T5 y T6 respectivamente. Se concluye que la mezcla de los extractos de ambos aislados ejercen un efecto positivo sobre el crecimiento y desarrollo radicular de brotes de melina, al ser aplicados tanto al enraizamiento al aire, como al pellet de turba, durante el periodo de aclimatización.

Palabras clave: *Trichoderma* spp., extractos de metabolitos, *Gmelina arborea*, promoción de crecimiento, enraizamiento.

Introducción

De acuerdo con Moya (2003), Serrano-Montero y Moya-Roque (2011) y la Oficina Nacional Forestal (ONF), (2013), la melina (*Gmelina arborea*) es la especie forestal más comercializada en el país, con uso en la industria de la construcción y el embalaje para el sector agroexportador. Reportes de la ONF (2013), indican que, para el año 2012, el procesamiento de maderas experimentó un decrecimiento correspondiente al 5% con respecto al 2011, mientras que para la madera en bruto, deflactó un descenso del 27,5% para el año 2013, lo que incluye la madera de melina. En contraposición a lo anterior, estos autores señalan que a partir del año 2005 al 2011, se registró incrementos en el precio de madera de melina, tanto en pie, en troza puesta en aserradero y aserrada, con excepción de la madera para tarima, cuyo incremento en el precio se ha extendido incluso al primer semestre del 2013. Sin embargo, en cuanto al entorno general de la industria de la madera, Barrantes y Ugalde (2013) mencionan que el procesamiento de fuentes nacionales se ha reducido en un 35% a partir del año 2007, tendencia que incluso para el año 2012 se mantiene, lo que ha conllevado al procesamiento de piezas de menor diámetro. Estos autores subrayan que la capacidad de mitigar esta situación de manera oportuna, se ve opacada por la necesidad de aumentar

significantly increased the height was 37,1%; however the mixture MOTrh+ LaBioTD37 (T5) inoculated to the base, increased the root length by 75%. Statistically it was evident that fresh biomass increased by 42,5% and 55% by MOTrh+LaBioTD37 applied to the base of the shoot (T5) and MOTrh+LaBioTD37 applied to the base of the shoot and inoculated the pellet (T6), besides significantly increasing dry biomass by 58,9%. Fresh root weight increased by 50% and 67% by MOTrh+LaBioTD37 applied to the base of the shoot and inoculated the pellet (T6) and MOTrh+LaBioTD37 applied to the base of the shoot (T5) respectively. Finally, dry weight improved by 51% and 68% by treatment T5 and T6. We concluded that the mixture of extracts from both isolates has a positive effect on growth and development of melina root shoots, when applied to both the air rooting, as the peat pellet during the acclimatization period.

Keywords: *Trichoderma* spp., extracts of metabolite, *Gmelina arborea*, growth promotion, rooting.

el área en una tasa de 7000 ha*año⁻¹ en plantaciones forestales como contraparte al alto consumo.

Aunado a esta situación, estas plantaciones han experimentado un incremento en enfermedades fungosas, entre ellas, la denominada como Síndrome de Muerte de la Corteza en Melina (SMCM) (Baltodano, 2007), siendo considerada como una fuerte amenaza a la actividad. Ante este panorama, acciones tales como la búsqueda de materiales con potencial genético competitivo, de buena calidad, resistente a las enfermedades que se manifiestan a nivel de campo, han incentivando a este sector hacia una silvicultura clonal (Jiménez, 2003; Murillo, 2004; Badilla y Murillo 2005).

En investigaciones desarrolladas en el Instituto Tecnológico de Costa Rica se han aislado e identificado a nivel morfológico y molecular, agentes implicados en la enfermedad del SMCM. Así como la selección de cepas de *Trichoderma* spp. A nivel *in vitro*, como una posible estrategia en miras al manejo integrado y la reducción del inóculo primario de estos agentes.

Considerando los aspectos mencionados, el uso de microorganismos benéficos, entre los que figuran hongos micorrizogénicos y antagonistas, constituye una herramienta trascendental a incorporar en los sistemas de propagación clonal. Howell (2003), Harman (2006)

y Harman (2011), mencionan que hongos del género *Trichoderma*, además de ser uno de los agentes de biocontrol más exitosos, atribuido a su capacidad de ejercer diferentes mecanismos de acción como micoparasitismo y antibiosis, tiene la capacidad activar los mecanismos de defensa de la planta y promover el crecimiento del sistema radical. Ambos aspectos, resaltan importancia en cuanto a la propagación clonal de especies forestales, en la que según Mesén (1998) la calidad del sistema radical de los brotes juveniles es fundamental, debido principalmente a la carencia de una raíz pivotante.

Por tal motivo el objetivo de esta investigación fue determinar el potencial de dos aislados nativos de *Trichoderma* como promotores del crecimiento vegetal de melina durante la propagación vegetativa de clones, esto como una alternativa preventiva para el manejo de enfermedades y aumento del vigor de los árboles desde la etapa de propagación en viveros clonales.

Materiales y métodos

La investigación se realizó en el invernadero perteneciente a la Escuela de Ingeniería Forestal (Sede Central Cartago, Costa Rica) y el proyecto Cooperativo de Mejoramiento Genético Forestal de Costa Rica (GENFORES), así como en el Laboratorio de Fitopatología y Biocontroladores de la Escuela de Agronomía, ambos del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos, ubicado en Santa Clara, distrito de Florencia, cantón San Carlos de la provincia de Alajuela, Costa Rica.

Se subdividió en dos fases, ambas desarrolladas bajo condiciones de minitúnel. En la primera etapa, se evaluaron dos aislados nativos del género *Trichoderma* spp., sobre el enraizamiento de brotes juveniles de melina (*G. arborea*), mientras que en la segunda fase se evaluó el efecto de estos aislados sobre el crecimiento y desarrollo de brotes enraizados. En ambos casos, se siguió la metodología de reproducción vegetativa de especies forestales propuesta por Badilla y Murillo (2005).

Selección del material vegetal

El material vegetal fue obtenido de la colección de clones del proyecto Cooperativo GENFORES. Se seleccionaron de forma aleatoria cuatro clones, los cuales se encuentran codificados como 56, 57, 60 y 100. Los mismos, se encontraban establecidos en mini-jardines clonales de ocho meses de renovación, con un espaciamiento de 7,5 cm entre planta e hilera, sobre camas con sustrato de arena y carbón vegetal.

Selección de los aislados de *Trichoderma* spp.

De la micoteca del Laboratorio de Fitopatología y Biocontroladores del Instituto Tecnológico de Costa Rica, se seleccionaron dos aislados nativos de *Trichoderma*

spp., por su potencial antagonista *in vitro* (datos no publicados) ante agentes asociados con la enfermedad denominada como “Síndrome de Muerte de la Corteza en Melina” (SMCM).

Estos aislados están codificados como LaBioTD37, cuya procedencia geográfica corresponde a Los Chiles, provincia Alajuela, mientras que el aislado MOTrh procede de Buenos Aires provincia de Puntarenas. En ambos casos, los aislados fueron obtenidos de muestras de suelo, de fincas comerciales dedicados a la actividad piñera.

Preparación de los extractos de metabolitos a partir de aislados de *Trichoderma* spp.

Se procedió a realizar siembras estriadas de cada uno en cajas de Petri que contenían Papa-Dextrosa-Agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit), las mismas se incubaron bajo luz continua a 28°C de temperatura y 80% de humedad durante un periodo de cinco días.

Transcurrido ese periodo, se siguió el protocolo descrito por Lorito (2013)¹ (comunicación personal) para la extracción de metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp., mediante fermentación líquida. A la solución base se adicionó 2 ml de suspensión de conidios a una concentración de 10⁹ conidios ml⁻¹, obtenida de cada aislado a evaluar. Esta mezcla se mantuvo en agitación constante a 180 rpm por un periodo de siete días, en un agitador orbital marca DIGISYSTEM®, bajo condiciones de luz artificial de forma continua y a una temperatura de 28°. El pH de la solución fue monitoreado cada 48 horas, en los que se realizaron ajustes con una solución NaOH (1 M) para mantener el pH de la solución en un rango entre 6 y 6,5. Finalizado el periodo de extracción, se tomaron muestras de cada solución, para la evaluación de la pureza y unidades formadoras de colonias (UFC) mediante siembras por extensión en medio de cultivo PDA (Difco Laboratories, Detroit).

Finalmente, para establecer los tratamientos, cada extracto crudo fue diluido en una relación de 1:1 con una suspensión de conidios en el orden de 10⁹ conidios ml⁻¹ del aislado correspondiente.

1. Lorito, M. 2013. Extracción de metabolitos secundarios de *Trichoderma* spp. por fermentación líquida. Departamento de Arboricultura, Botánica y Patología Vegetal. Universidad de Napoli Federico II, Nápoles, Italia. email: lorito@unina.it

Cuadro 1. Detalle de los tratamientos aplicados sobre la base brotes juveniles de melina, bajo condiciones de minitúnel.

Table 1. Details of treatments applied on basis melina youth outbreaks under minitunnel condition.

Código	Tratamiento	Descripción
T1	Testigo	Enraizante: Ácido Indol Butírico (0,30% p/p)
T2	MOTrh	
T3	LaBioTD37	Extracto de metabolitos y biomasa
T4	MOTrh+ LaBioTD37	
T5	MOTrh	
T6	LaBioTD37	Extracto de metabolitos, biomasa y enraizante
T7	MOTrh+ LaBioTD37	

I Fase. Efecto de extractos de metabolitos de dos aislados nativos de *Trichoderma* spp., sobre el enraizamiento al aire de brotes juveniles de melina (*G. arborea*).

Selección de material: A partir de los jardines clonales, se seleccionaron brotes de primer crecimiento, con siete días de rebrote, los cuales fueron podados a una longitud de cuatro centímetros desde el ápice, utilizando tijeras previamente desinfectadas con alcohol al 70% y pases por flama. Asimismo, a cada brote se le eliminó 2/3 de la lámina foliar, tal como lo sugieren Badilla y Murillo (2005).

Tratamientos: La aplicación de los tratamientos (Cuadro 1), consistió en la inmersión de la base del brote en la solución correspondiente, por un periodo de cinco minutos. La aplicación de estos tratamientos se realizó al atardecer, con el fin de propiciar el establecimiento de los aislados de *Trichoderma* spp. Al tratamiento testigo solamente se le aplicó hormona enraizante en la base de cada brote.

Posteriormente, los brotes se colocaron en forma individual en los orificios de las celdas de bandejas para almácigo, las cuales fueron dispuestas de manera invertida, y recortadas previamente, en secciones de 20 celdas. Las bandejas fueron llevadas a un minitúnel con dimensiones de un metro de ancho, cinco metros largo y 0,51 metro de altura, cubierto con plástico transparente. Las condiciones internas de temperatura del mismo oscilaron entre los 35°-40°C y una humedad superior al 80%.

Mantenimiento y monitoreo: Los brotes permanecieron en periodo de enraizamiento durante 20 días, en el que recibieron un manejo basado en riegos por microaspersión con una duración de un minuto, con un caudal de emisión de 1,2 l*min⁻¹. Dichos riegos fueron distribuidos en periodos de una hora entre cada uno, para un total de nueve descargas por día.

Variables evaluadas: Las variables evaluadas fueron el porcentaje de mortalidad, porcentaje de brotes enraizados considerando los primeros nueve días desde el momento de la poda. La longitud de la raíz

más prominente desde la base del brote hasta el ápice radicular, así como el diámetro basal del brote a un cm por encima de la base del mismo, fueron evaluados mediante un vernier digital marca Stainless® y finalmente se contabilizó el número de raíces emitidas por brote. Estas variables fueron evaluadas a los 20 días, posterior a la aplicación de los tratamientos.

Diseño experimental: El ensayo siguió un modelo en Bloques Completos al Azar, utilizando como factor de bloqueo el clon. Por lo tanto, el mismo contó con cuatro repeticiones (bloques) por tratamiento. Cada unidad muestral consistió en una bandeja con 20 brotes. Los resultados fueron analizados por medio de los modelos lineales generalizados y comparación de medias con la prueba de Bonferroni (p<0,05). Adicionalmente, se realizaron análisis multivariados de Componentes Principales (ACP), Análisis de Conglomerados (AC), Análisis Discriminante (AD) y análisis de la Varianza Multivariado, con el fin de determinar el tratamiento promisorio de esta etapa para ser evaluado en la fase II. Los análisis estadísticos se ejecutaron mediante el paquete estadístico InfoStat versión 2014 (Di Renzo et al., 2014).

Fase II. Efecto de extractos de metabolitos de dos aislados de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y desarrollo de brotes enraizados de melina durante la aclimatización bajo condiciones de minitúnel.

Selección de material: A partir de los resultados obtenidos en la primera fase del ensayo, se seleccionaron los tratamientos promisorios para una segunda evaluación en contraste con brotes enraizados sin tratar.

Preparación de sustrato y tratamientos: Para esta etapa, se utilizaron pellet de turba de 30 mm de diámetro marca Jiffy-7® previamente hidratados. Éstos se esterilizaron tres veces por periodos de quince minutos, a una temperatura de 121°C y 1,2 Kg*cm⁻² de presión, con una diferencia entre cada una de éstas de 24 h.

Una vez esterilizados, se sumergieron 40 pellet (10 por repetición) en recipientes que contenían soluciones de

Cuadro 2. Detalle de los tratamientos aplicados sobre pellet de turba y brotes enraizados de melina bajo condiciones de minitúnel.

Table 2. Details of treatments applied on peat pellet and melina rooted shoots under minitunnel conditions.

Código	Tratamiento	Descripción	Inoculación
T1	Testigo Absoluto	Agua destilada y estéril	
T2	MOTrh		
T3	LaBio TD37	Extracto de metabolitos y biomasa	Inmersión del pellet
T4	MOTrh+ LaBio TD37		
T5	MOTrh+ LaBio TD37		Dirigida al brote
T6*	MOTrh+ LaBio TD37	Extracto de metabolitos y biomasa	Dirigida al brote e inmersión del pellet

* Tratamiento proveniente de la fase I.

cada uno de los tratamientos (Cuadro 2) por un periodo de diez minutos. Posteriormente, brotes enraizados sin tratamiento previo, así como los brotes provenientes del tratamiento promisorio de la primera fase, fueron trasplantados en los pellets de turba inoculados.

Mantenimiento y monitoreo: Una vez trasplantados, éstos fueron colocados en el minitúnel por un periodo de 16 días, durante el cual recibieron un manejo que consistió en la aplicación de agua asperjada al follaje con el fin de evitar la deshidratación. Trascorrido este periodo, se realizaron mediciones de altura de la base de la brote hasta la parte apical, diámetro basal tomando como base un centímetro por encima de la base de la planta, así como longitud de la raíz más prominente. Las lecturas para las variables antes mencionadas fueron evaluadas mediante un vernier digital marca Stainless®.

Variables evaluadas: Se contabilizó el número de raíces emitidas por brote, considerando las raíces con un tamaño igual o superior a un milímetro de longitud. La biomasa fue evaluada seccionando cada planta en parte aérea y parte radical, en cada caso, se determinó el peso fresco mediante una balanza Ohaus modelo Pioneer.

El peso seco de la parte aérea y la parte radical fueron determinados mediante una balanza analítica marca Ohaus modelo Adventurer™ Para esto, las muestras fueron colocadas de forma individual en bolsas de papel Kraff y se colocaron en una estufa de aire forzado a una temperatura de 55°C por un periodo de 24 hr.

Diseño experimental: El ensayo siguió un diseño en bloques completos al azar, considerando el clon como factor de bloqueo, además contó con cuatro repeticiones (bloques) y ocho unidades de observación por repetición. Los datos fueron analizados por medio de los modelos lineales generalizados y prueba de medias según Bonferroni ($p < 0,05$), mediante el paquete estadístico InfoStat versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

Resultados

Fase I. Efecto de extractos de metabolitos de dos aislados nativos de *Trichoderma* spp., sobre el enraizamiento al aire de brotes de melina.

De acuerdo con los datos obtenidos en esta fase del ensayo (Cuadro 3), no se determinó diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad ($p = 0,0712$) para ninguno de los tratamientos evaluados, no obstante, el análisis estadístico evidenció, que el tratamiento T6 presentó la media más baja para esta variable. Mientras que, para la variable porcentaje de brotes enraizados se encontraron diferencias significativas ($p = 0,0006$), con diferencias en los tratamientos T6 y T7 con respecto al tratamiento T3, sin embargo estos mismos tratamientos (T6, T7 y T3) no difieren estadísticamente con respecto a los tratamientos T1, T2, T4 y T5.

Para la variable diámetro basal del brote, no se detectó diferencias significativas ($p = 0,6192$) en ninguno de los tratamientos evaluados, tal como se observa en el cuadro 3.

Con respecto a la variable número de raíces emitidas por brote, como se observa en la figura 1A, el análisis estadístico evidenció diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) del tratamiento T5 con respecto a los tratamientos T1, T2, T3 y T4. Por su parte, los tratamientos T6 y T7, no presentaron diferencias significativas con respecto a tratamiento T5. Mientras que en la figura 1.B, se observa que para la variable longitud de raíz prominente, no se obtuvo diferencias significativas ($p = 0,5598$) para ninguno de los tratamientos evaluados con respecto al testigo, siendo el tratamiento T7 el que presentó la media más alta.

De acuerdo al análisis de componentes principales (ACP) (Figura 2.A), se encontró que el componente uno aportó el 49,9% de la variabilidad de los datos, mientras que el componente dos aportó el 23,9%. Las variables correspondientes al porcentaje de brotes enraizados, número de raíces emitidas por brote y la longitud de

Cuadro 3. Efecto de extractos de metabolitos más biomasa de dos aislados nativos de *Trichoderma* spp., sobre brotes juveniles de melina durante el enraizamiento al aire en condiciones de minitúnel.

Table 3. Extracts of metabolites effect of more biomass two native isolates of *Trichoderma* spp. on youth melina outbreaks during the rooting air in minitunnel conditions.

Tratamiento	Variables*					
	Porcentaje de mortalidad		Porcentaje de brotes enraizados		Diámetro basal del tallo	
	Media (%)	EE	Media (%)	EE	Media (%)	EE
T6	2,5	2,5 A	97,5	2,5 A	2,0254	0,0132 A
T7	8,75	3,15 A	95	2,04 A	1,9967	0,00653 A
T1	11,25	1,25 A	91,3	1,25 AB	2,0029	0,0113 A
T4	11,25	1,25 A	88,8	3,15 AB	2,0425	0,0407 A
T2	8,75	3,15 A	88,8	4,27 AB	2,0146	0,00885 A
T5	3,75	3,75 A	87,5	1,44 AB	2,0108	0,00801 A
T3	7,5	4,33 A	78,8	2,39 B	2,0054	0,00832 A

*Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según prueba de Bonferroni. Ajuste de la heteroscedasticidad mediante la función *pldent* para bloque.

la raíz más prominente, aportan mayor peso al análisis de los datos, ubicándose en los primeros lugares del componente principal uno. Se observó que el porcentaje de brotes enraizados y el número de raíces pueden considerarse como variables estrechamente asociadas

Asimismo, se observa que el efecto de los tratamientos T5 y T6 se expresa adecuadamente en las variables de porcentaje de brotes enraizados y número de raíces, mientras que el T7 por medio de la variable longitud de la raíz. La variable de diámetro basal es la que mejor representa el componente principal dos, el cual aporta el 24,9% de la variabilidad de los datos.

Considerando las variables evaluadas en el presente estudio, el análisis por conglomerados (Figura 2.B) indicó la conformación de tres grupos, de los cuales, el análisis de varianza multivariado mostró diferencias significativas (Wilks, $p = 0,0004$) entre los conglomerados dos (T5, T6) y tres (T7) con respecto al conglomerado uno (T1, T2, T3, T4). Aunque, los conglomerados dos y tres son similares, para efectos de melina clonada, las variables de longitud de la raíz y porcentaje de brotes enraizados y número de raíces, son variables de suma importancia en el proceso de propagación vegetativa. En este sentido, el conglomerado tres (T7) presenta valores medios más altos para las dos primeras variables, mientras que el valor de número de raíces son muy similares a las del conglomerado dos. Por tal razón, el tratamiento T7 se considera como el tratamiento que mejor explica el efecto sobre estas variables y por lo tanto, es seleccionado para la segunda etapa del estudio.

En relación con lo anterior, el análisis de discriminante registró un porcentaje de sesgo total del 17,8% en la conformación de los grupos, donde el mayor sesgo se ubicó en el conglomerado dos (37,5%).

Fase II. Efecto de dos aislados de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de brotes enraizados de melina en climatización bajo condiciones de minitúnel.

El análisis estadístico de los resultados evidenció diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) para la variable altura del brote enraizado. De acuerdo con la prueba de Bonferroni, los tratamientos T3, T4, T5 y T6 fueron superiores con respecto al tratamiento testigo (T1) (Figura 3). En este sentido, los tratamientos T4, T5 y T6, evidenciaron incrementos en el crecimiento en un rango de 28,5% a 37,13%, obteniendo las medias más altas.

En el Cuadro 5, se presentan las medias obtenidas por parte de los tratamientos evaluados sobre las variables de número de hojas y el diámetro basal del brote, para las cuales no se evidenció diferencias significativas ($p = 0,0750$) entre los tratamientos evaluados.

Para la variable número de raíces emitidas por brote (Figura 3A), el análisis estadístico refleja diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) entre tratamientos. La prueba Bonferroni detectó diferencias del tratamiento T4 con respecto al tratamiento testigo (T1), siendo el tratamiento T4 superior en un 40%. No obstante, los tratamientos T3 y T5 son estadísticamente similares al tratamiento T4.

Como se muestra en la Figura 4B, se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) entre tratamientos para la variable longitud de raíz. Según la prueba de Bonferroni, el tratamiento T5 presentó diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos evaluados, obteniendo un incremento de 75% en comparación con el tratamiento testigo (T1).

En cuanto a las variables peso fresco y seco de la parte aérea (Figura 5A), se registraron diferencias altamente

Cuadro 4. Análisis de la varianza multivariado sobre parámetros de crecimiento de brotes juveniles de melina durante el enraizamiento al aire en condiciones de minitúnel. Basado en comparación de medias de Hotteling a un 95% de confianza.

Table 4. Multivariate analysis of variance on growth parameters youth melina outbreaks during the rooting air on minitúnel conditions. Based on comparison of means Hotteling a 95 % confidence.

Conglomerado	Longitud raíz (mm)	Diámetro basal (mm)	Brotos enraizados (%)	Mortalidad (%)	No raíces	n
1	17,18	2,02	86,88	9,69	2,71	16 A
2	18,58	2,02	92,50	3,13	5,79	8 B
3	22,9	2,02	95,00	8,75	5,29	4 B

Cuadro 5. Efecto de extractos de metabolitos más biomasa de dos aislados nativos de *Trichoderma* spp. sobre el diámetro basal del tallo y número de hojas por plántula según tratamientos evaluados sobre plántulas de melina en condiciones de minitúnel.

Table 5. Effect of metabolites and biomass extracts two native isolates of *Trichoderma* spp. on basal stem diameter and number of leaves per seedling as treatments evaluated on melina seedlings in minitúnel conditions.

Tratamiento	Variables*			
	Diámetro basal del tallo (mm)		Número de hojas	
	Media	E.E.	Media	E.E.
T1	2,08	0,11 A	1,94	0,1 A
T2	2,16	0,04 A	1,87	0,1 A
T3	2,23	0,1 A	1,87	0,14 A
T4	2,17	0,05 A	2,03	0,07 A
T5	1,79	0,07 A	2,06	0,06 A
T6	2,05	0,09 A	2,07	0,06 A

*Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según prueba de Bonferroni. Ajuste de la heteroscedasticidad mediante función *p*ldent para bloque.

significativos ($p < 0,0001$) entre los tratamientos. La prueba Bonferroni mostró que para el peso fresco, los tratamientos T5 y T6 mostraron diferencias con respecto a los tratamientos T1, T2 y T3. Los tratamientos T5 y T6 no presentaron diferencias estadísticas con respecto al tratamiento T4. De acuerdo con lo anterior, se registraron incrementos en esta variable en un rango del 42,5% al 55,0%, por parte de los tratamientos T4, T5 y T6 sobre el testigo. Considerando la parte radical, se determinó que el tratamiento T5, fue significativamente superior con respecto a los tratamientos T1, T2, T3 y T4, con un incremento en el peso fresco radical del 67% en comparación con el tratamiento testigo (T1). Este tratamiento es similar estadísticamente con el T6, el cual superó al tratamiento testigo (T1) en un 50%.

En cuanto a las variables biomasa seca (5B), estas presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$). Para la parte aérea, el tratamiento T6 evidenció diferencias con respecto a los tratamientos T1, T2, T3 y T4, superando al tratamiento testigo (T1) en un 58,92%. En cuanto a la parte radical, análisis estadístico indicó que el tratamiento T6 presenta diferencias con respecto a los tratamientos T1, T2, T3 y T4, registrando un incremento comprendido entre el 50,8%-67,9% por parte de los tratamientos T5 y T6 con respecto al testigo.

Discusión

I Fase. Efecto de extractos de metabolitos más biomasa de dos aislados nativos de *Trichoderma* spp., sobre el enraizamiento al aire de brotes juveniles de melina (*G. arborea*).

Especies del género *Trichoderma*, tales como *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, entre otras, han sido ampliamente estudiadas, no solo por ser uno de los agentes de biocontrol más exitosos ante fitopatógenos que afectan negativamente los cultivos, sino también por su capacidad de generar respuestas en las plantas, que resultan en incrementos en parámetros de crecimiento, resistencia y productividad (Harman, 2000; Harman et al., 2004, Harman, 2011).

Considerando lo anterior, los resultados obtenidos en esta fase del estudio para la variable porcentaje de mortalidad en brotes de melina, evidenciaron que bajo el sistema de enraizamiento aeropónico, los tratamientos evaluados no generaron diferencias estadísticas con respecto al tratamiento testigo, No obstante, las medias comprendidas entre 2,5% y 8,75% de mortalidad, para los tratamientos T2, T3, T5, T6 y T7, son menores a la

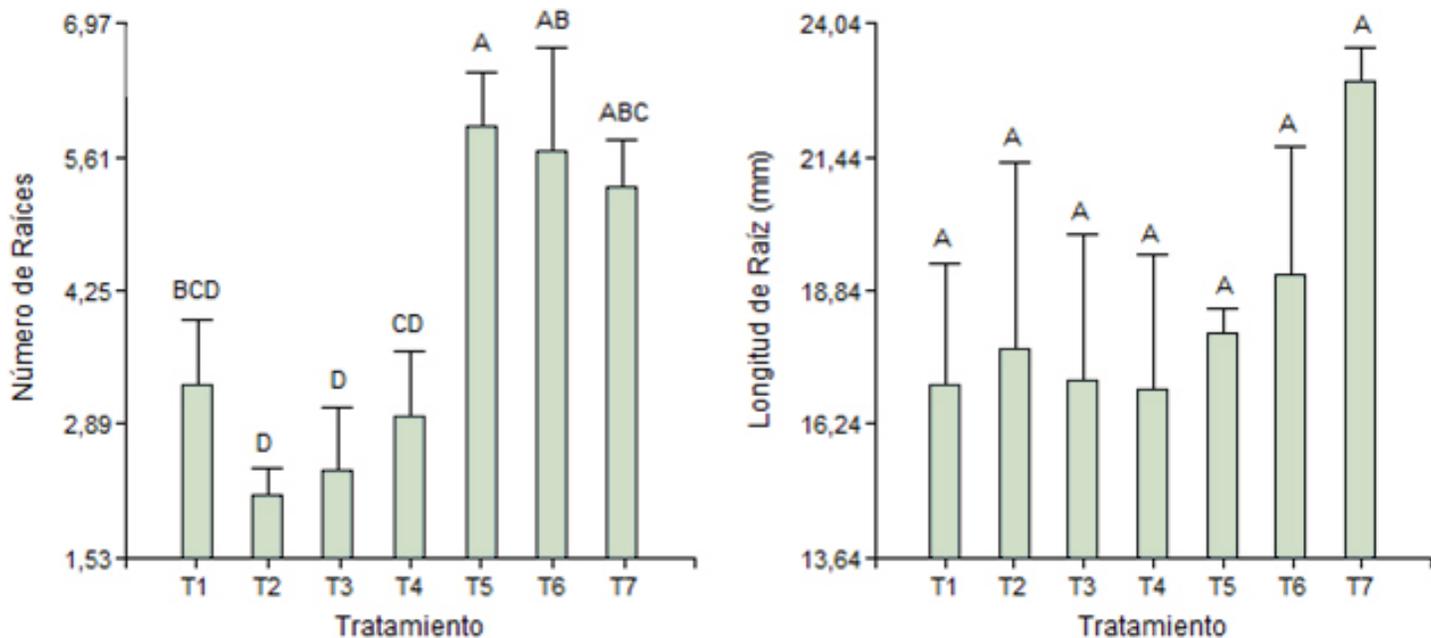


Figura 1. Efecto de extractos de metabolitos más biomasa de dos aislados nativos de *Trichoderma* spp. sobre el enraizamiento al aire de brotes juveniles de melina en condiciones de minitúnel. A. Número medio de raíces por brote de melina según tratamiento. B. Longitud media de la raíz más prominente de brotes de melina según tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según prueba Bonferroni. Ajuste de la heteroscedasticidad mediante la función *pDIdent* para bloque.

Figure 1. Metabolites effect and biomass extracts two native isolates of *Trichoderma* spp. on rooting juvenile air outbreaks melina able to minitúnel. A. Average number of roots per shoot melina as treatment. B. Average length of the most prominent result of outbreaks of melina as treatment. Different letters indicate significant differences ($p < 0,05$) according to Bonferroni test. Setting the heteroskedasticity by *pDIdent* function block.

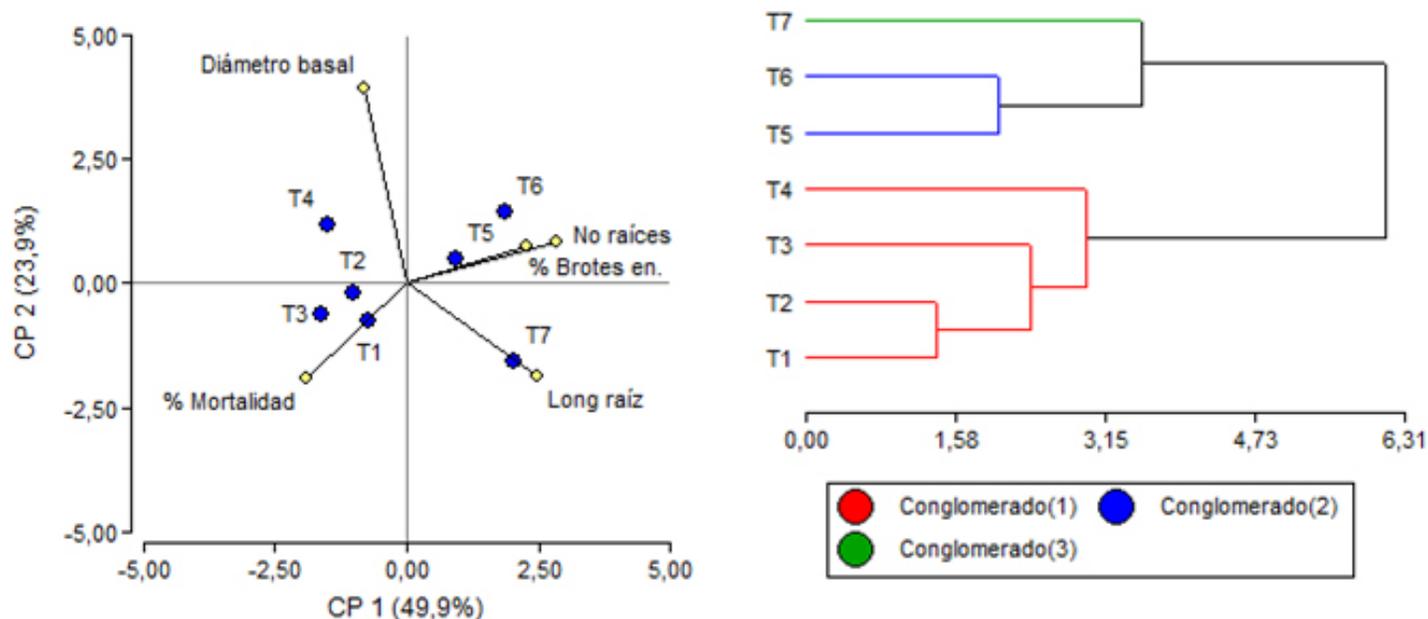


Figura 2. Análisis multivariado de los parámetros de crecimiento de brotes juveniles de melina, durante el enraizamiento al aire en condiciones de minitúnel. A. Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP). B. Dendrograma del Análisis de Conglomerados (AC), mediante el método Ward y distancia Euclídea.

Figure 2. Multivariate analysis of growth parameters youth melina outbreaks during the rooting air on minitúnel conditions. A. Biplot the Principal Component Analysis (PCA). B. Dendrogram of cluster analysis (CA), using the Ward method and Euclidean distance.

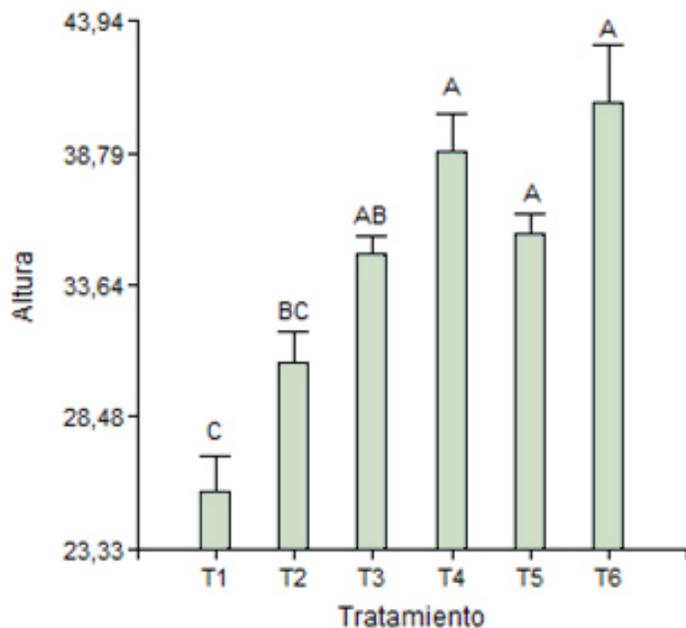


Figura 3. Efecto de extractos de metabolitos más biomasa, de dos aislados nativos de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de plántulas de melina enraizadas en condiciones de minitúnel. A. Altura promedio (mm) de brotes enraizados en pellet de turba según tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según prueba Bonferroni. B. Brotes juveniles enraizados de melina, 16 días después del trasplante. Izquierda brotes sin aplicación (Testigo). Derecha Brotes tratados con MOTrh+LaBioTD37 al momento del trasplante. Ajuste de la heteroscedasticidad mediante la función *pIldent* para bloque.

Figure 3. Effect of extracts of metabolites and two native isolates biomass of *Trichoderma* spp. on the growth of seedlings rooted in melina minitúnel conditions. A. Average (mm) outbreak rooted in peat pellet according Height treatment . Different letters indicate significant differences ($p < 0,05$) according to Bonferroni test . B. Sprouts rooted melina juveniles 16 days after transplantation. Left shoots without applying (control) . Shoots treated right MOTrh + LaBioTD37 at transplant. Setting the heteroskedasticity by *pIldent* function block.

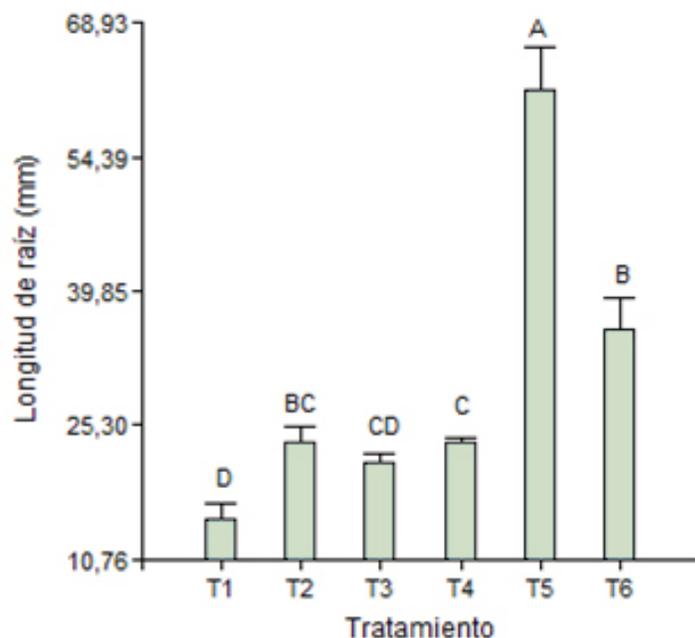
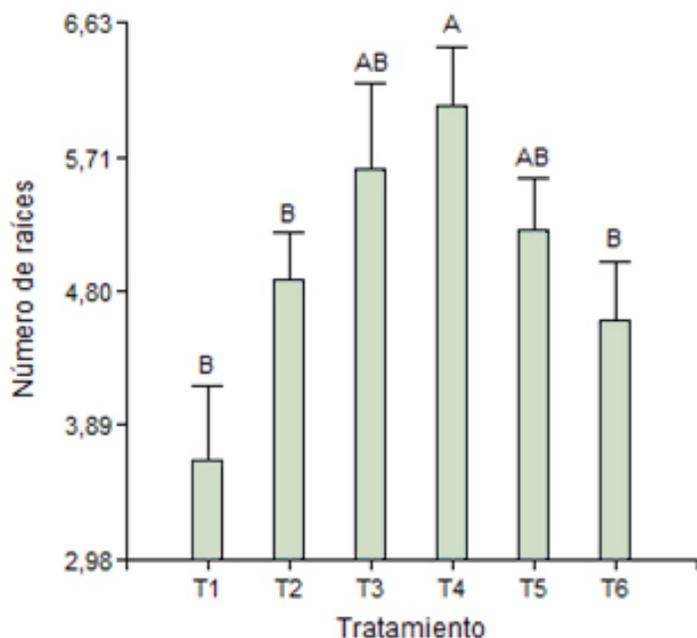


Figura 4. Efecto de extractos de metabolitos más biomasa de dos aislados nativos de *Trichoderma* spp. sobre el sistema radical de brotes enraizados en pellet de turba, 16 días después del trasplante. A. Número de raíces promedio por brote según tratamiento. B. Longitud de la raíz más prominente (mm) en promedio por brote según tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) según prueba Bonferroni. Ajuste de la heteroscedasticidad mediante la función *pIldent* para bloque.

Figure 4. Effect of metabolites and two native biomass extracts isolates of *Trichoderma* spp. on rooted shoots radical system in peat pellet 16 days after transplantation. A. Average number of roots per shoot as treatment. B. Length of the most prominent root (mm) in average per outbreak as treatment. Different letters indicate significant differences ($p < 0,05$) according to Bonferroni test. Setting the heteroskedasticity by *pIldent* function block.

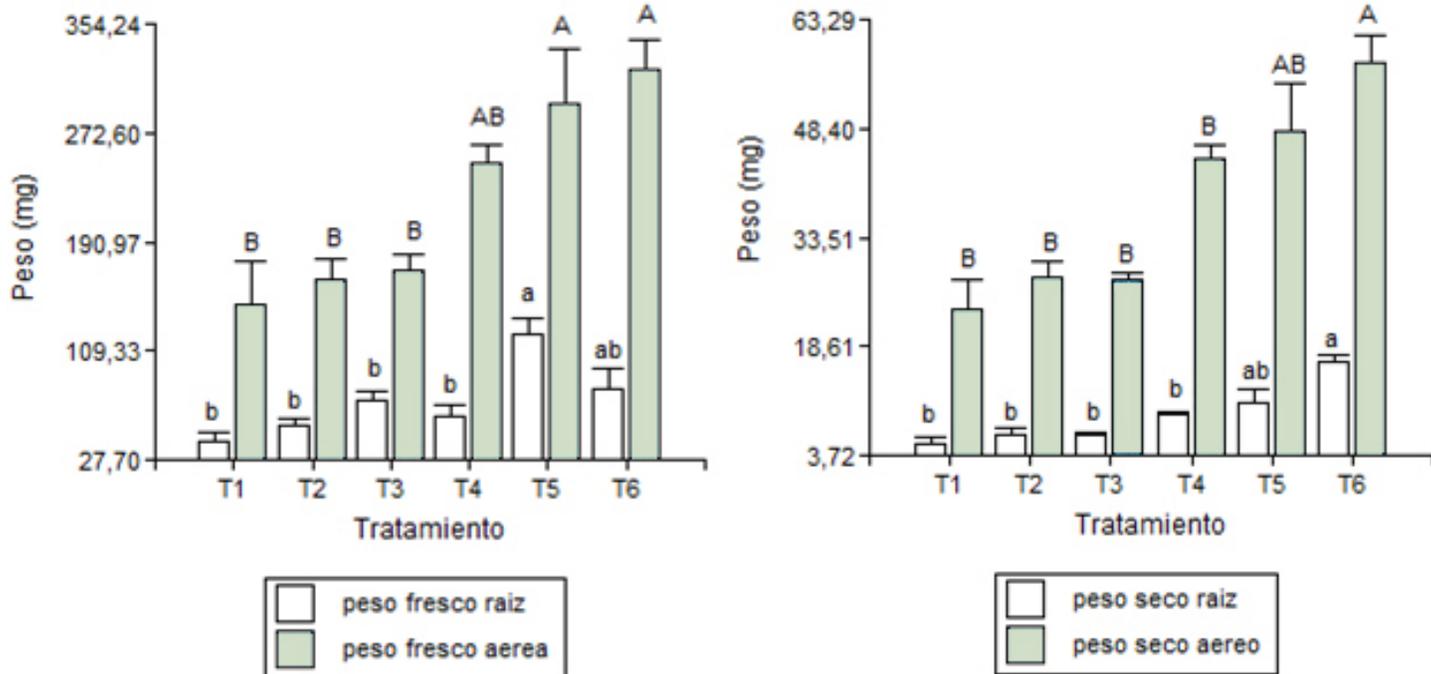


Figura 5. Efecto de extractos de metabolitos más biomasa de dos aislados nativos de *Trichoderma* spp., sobre la acumulación de biomasa de plántulas de melina en condiciones de minitúnel. A. Biomasa en términos de peso fresco promedio (mg) por plántula, seccionado en parte aérea y parte radical. B. Biomasa en términos de materia seca acumulada (mg) por plántula, seccionada en parte aérea y parte radical. Letras distintas indican diferencias significativas según prueba de medias de Bonferroni ($p < 0,05$). Ajuste de la heteroscedasticidad mediante la función *pdldent* para bloque.

Figure 5. Effect of metabolites and two native biomass extracts isolates of *Trichoderma* spp. on biomass accumulation in melina seedlings minitunnel conditions. A. Biomass in terms of average fresh weight (mg) per seedling, sectioned in aerial and radical part. B. Biomass in terms of accumulated dry matter (mg) per seedling, sectioned aerial and radical part. Different letters indicate significant differences by means of Bonferroni test ($p < 0,05$). Setting the heteroskedasticity by *pdldent* function block.

reportada por Chacón y Murillo (2005), quienes para la misma especie forestal, indican que en la segunda semana de evaluación obtuvieron un 16% de mortalidad de brotes en proceso de enraizamiento en sustrato de arena, bajo condiciones de minitúnel. Estos mismos autores, mencionan que éstos porcentajes de mortalidad se deben a aspectos tales como la succulencia del material vegetal, la exposición de tejido interno, así como las secreciones de sabia tras la poda, le confiere una condición de susceptibilidad a los brotes de melina.

Aunado a lo anterior, es importante considerar aspectos característicos del sistema de enraizamiento, tales como la alta humedad y temperatura, los cuales se convierten en factores condicionantes que, en concordancia con lo indicado por Agrios (2005), en presencia de un agente fitopatógeno, sea éste de tipo fungoso o bacteriano, puede desencadenar un proceso de infección, lo que posteriormente desencadena en la muerte de los brotes. En el presente estudio, la reducción en el porcentaje de mortalidad puede estar relacionado con la capacidad que algunas cepas de *Trichoderma* spp tienen de conferir a las plantas mayor resistencia ante condiciones de estrés biótico y abiótico, estas condiciones provocan mayor acumulación de intermediarios reactivos de oxígeno, conduciendo a la muerte celular programada (Mittler,

2002). Mastouri, Bjorkman & Harman (2010) y Harman (2011) menciona que algunas cepas de *Trichoderma*, específicamente *T. harzianum* T22, mejoran el patrón de expresión de algunas enzimas en la planta, como es el caso de la glutathione-ascorbate, la cual recicla antioxidantes más rápidamente y con ello reduce los efectos del estrés.

Con respecto al porcentaje de brotes enraizados del presente ensayo, aunque no se generaron diferencias significativas con respecto al testigo por parte de los tratamientos T2, T4, T5, T6 y T7; las medias más altas para esta variable fueron evidenciadas por los tratamientos T6 y T7, con porcentajes del 97,5% y 95% respectivamente, demostrando una mejora importante, la cual se traduce en mayor eficiencia en el proceso de enraizamiento. Estos resultados superan los índices obtenidos por Chacón y Murillo (2005), quienes califican de bueno el porcentaje de brotes enraizados en melina superior al 80%, lo que concuerda con lo sugerido por Badilla y Murillo (2005), quienes aducen que la tasa de brotes enraizados deben ser superiores al 70%, dado que índices por debajo de este valor, afectan la sostenibilidad económica de viveros dedicados a la producción masiva.

Al no evidenciarse diferencias estadísticas de los T2, T3 y T4, con respecto al testigo (T1), este comportamiento se puede atribuir a que estos tratamientos tienen un efecto

igual a la hormona enraizante de uso convencional. Al respecto, Vinale et al. (2008a) y Mukherjee et al. (2012), mencionan que *Trichoderma*, el patógeno y la planta hospedera, componen una relación establecida bajo estas tres vías, de las cuales, durante el proceso de interacción de algunas especies de *Trichoderma*, al colonizar las raíces de la planta producen una serie de sustancias, las cuales según Björkman (2004) desencadenan un efecto auxínico, con lo cual promueven un mejor desarrollo del sistema radical.

En relación con lo anterior, Contreras-Cornejo et al. (2009) reportan que algunos aislados de *Trichoderma* tienen la capacidad de producir Ácido 3-Indol Acético (AIA) incrementando el número de raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*, al ser expuestas a cultivos puros de *T. virens*, considerado como un mecanismo asociado a la promoción del crecimiento de las plantas.

Estos mismos autores determinaron que tres compuestos derivados del Indol obtenidos a partir de la misma cepa, al ser aplicados a plántulas de *A. thaliana*, mostraron diferentes respuestas en función de la dosis utilizada, por lo que a bajas dosis se promueve el crecimiento, mientras que a dosis altas éste se ve reprimido.

En concordancia con los resultados obtenidos sobre la variable de número de raíces emitidas por brote, los tratamientos T2, T3 y T4 no difieren del T1, lo que indica que los extractos crudos con biomasa de ambos aislados en forma individual y mezclados ejercieron un efecto similar al del enraizante, lo cual sugiere que la aplicación de estos aislados de *Trichoderma* spp. demostraron ser igualmente efectivos que el ácido 3 Indolbutírico aplicado convencionalmente en la base de los brotes. Adicionalmente, cabe resaltar que, aunque melina es considerada como una especie de fácil enraizamiento, las hormonas utilizadas en para este proceso en la mayoría de especies forestales son a base de Ácido Indolbutírico.

En estudios desarrollados por Harman et al. (2008), se reporta que la aplicación de *T. harzianum* T22 en la base de brotes de tomate, resultó ser más eficiente sobre el número de raíces y la longitud de las mismas, en comparación con brotes tratados con hormonas y a su vez, con respecto a brotes sin tratamiento alguno. Sin embargo, estos autores emplearon una formulación en polvo, a diferencia de la utilizada en el presente estudio, lo cual deja entrever que el tipo de formulación puede incidir en los resultados obtenidos. Además, los riegos constantes dentro del minitúnel pueden ocasionar pérdida de los mismos por escurrimiento. Hoyos-Carvajal, Orduz & Bisset (2009) reportan que diferentes aislados pertenecientes a las especies *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. brevicompactum* y *T. harzianum*, producen AIA o compuestos análogos en presencia de triptófano; sin embargo, estos autores determinaron diferencias entre los compuestos producidos entre los aislados, incluso dentro de la misma especie.

Por su parte el tratamiento T5, seguido por los tratamientos T6 y T7, incrementaron significativamente el número de raíces emitidas por brote (Figura 6), demostrando que la incorporación de *Trichoderma* en los sistemas de enraizamiento, mejoraron la calidad del sistema radical. Estos mismos tratamientos evidenciaron las medias más altas en cuanto a la longitud de las raíces, principalmente T7, aunque en comparación con el testigo, estos tratamientos no reflejaron diferencias estadísticas. Esto probablemente debido al corto periodo de evaluación, dado que en la etapa de enraizamiento se pretende anticipar el proceso de formación del sistema radical y de esta forma aumentar la eficiencia en el uso de los recursos cuando éstos sean trasplantados al pellet de turba. No obstante, en las figuras 1B y 6, se puede observar que la media reflejada por T7 es mayor que el tratamiento testigo.

Estos resultados sugieren un posible efecto sinérgico entre la aplicación de extractos crudos más biomasa de los aislados de *Trichoderma* spp. evaluados (T5, T6, T7) y la hormona enraizante (T1), lo cual es congruente con Gravel et al. (2007), quienes indican efectos sinérgicos entre *T. atroviride* y Ácido 3-Indolacético (AIA) exógeno, en donde esta cepa evidenció degradación en forma parcial de IAA a nivel *in vitro*. Estos aumentó la concentración de esta misma hormona de manera exógena, en un rango de 0-10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en presencia de esta cepa.

Fase II. Efecto de extractos de metabolitos más biomasa de dos aislados nativos de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de brotes enraizados de melina, en aclimatización bajo condiciones de minitúnel.

La capacidad de cepas pertenecientes a distintas especies del género *Trichoderma* de establecer procesos de interacción que benefician a las plantas, promueven el uso de este agente en diferentes sistemas de producción principalmente en almácigos, tanto como una alternativa de tratamiento pregerminativo dirigido a las semillas, como en la propagación vegetativa de especies de interés agrícola y forestal, a fin de mejorar la calidad y productividad (Donoso, Lobos y Rojas, 2008; Vinale et al., 2008a; Hohmann et al., 2011; Hermosa et al., 2012).

En el presente estudio, se determinó que al aplicar extractos crudos de metabolitos más biomasa de dos aislados de *Trichoderma* spp., la altura de los brotes enraizados de melina se incrementa en un rango del 28,5 al 37,1%; correspondiente a los tratamientos T3 y T4 (Figura 3 y Figura 7), así como los tratamientos provenientes de la fase I (T5 y T6), evidenciando estos dos últimos tratamientos, un mejor comportamiento en el crecimiento tras su incorporación desde el proceso de enraizamiento, e incluso durante el proceso de aclimatización. Asimismo, los resultados obtenidos son concordantes con los reportados por Donoso



Figura 6. Efecto de extractos más biomasa de dos aislados nativos de *Trichoderma* spp., sobre el enraizamiento al aire de brotes juveniles de melina de 18 días después de la poda, durante el enraizamiento al aire en condiciones de minitúnel. A. brotes tratados con enraizante (manejo convencional) (T1). B. Brotes tratados con la mezcla (T4). C. Brotes tratados con enraizante más la mezcla de los aislados MOTrh+LaBioTD37 (T7).

Figure 6. Extracts effect and two native biomass isolates of *Trichoderma* spp. on rooting shoots juvenile air melina 18 days after pruning, during rooting in air minitunnel conditions. A. sprouts treated with rooting (conventional management) (T1). B. sprouts treated with the mixture (T4). C. sprouts treated with rooting more isolated mixing LaBioTD37 MOTrh + (T7).

et al., (2008), quienes determinaron un incremento significativo en la altura de plántulas de pino a partir de estacas enraizadas, mediante la aplicación de biomasa de una cepa nativa de *T. harzianum*, dirigido al sustrato compuesto de perlita más compost. De igual forma, Adams et al. (2007), reporta incrementos en el crecimiento del 40% tras la aplicación de un producto formulado a base de la cepa *T. harzianum* T22 sobre la especie *Salix fragilis* con respecto a plantas sin tratar.

Vinale et al. (2008b), indican que la promoción del crecimiento de plantas ejercido por especies de *Trichoderma*, intervienen metabolitos secundarios tales como anthraquinones $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, T39butenolide $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y harzianolide $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que incrementaron la altura de plántulas de trigo; lo cual puede explicar los resultados obtenidos sobre la variable de altura. Sin embargo, se debe considerar que estos autores extrajeron dichos metabolitos de las cepas T22, T39, A6 de *T. harzianum* y P1 de *T. atroviride*, lo cual está influenciado por algunos factores, tal como lo indican Hoyos-Carvajal et al. (2009) y Zeilinger y Schuhmacher (2013), quienes concuerdan que factores como características propias del aislado, así como condiciones físicas del medio de cultivo y la temperatura, condicionan el tipo y concentración de los metabolitos producidos.

De acuerdo con el análisis de los resultados, sobre las variables de diámetro basal y número de hojas, no se generaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados con respecto al testigo, no obstante, esto puede ser atribuido al periodo de evaluación, ya que al ser comparados con reportes de Cubillos-Hinojosa, Valero y

Mejía, (2009), quienes tras evaluar la aplicación de dos cepas de *T. harzianum* a diferentes concentraciones sobre plántulas de maracuyá, indican incrementos en ambas variables en las concentraciones de biomasa más altas (106-108), siendo incluso inferiores a la concentración utilizada en el presente estudio. Sin embargo el periodo evaluado por estos autores fue de dos meses, contrario a los 16 días en el caso de los brotes enraizados de melina de este estudio. Cabe considerar que la melina expresa un potencial de crecimiento posterior a la etapa de minitúnel.

Harman et al. (2008) y Hill (2012), mencionan que la aplicación de aislados específicos de *Trichoderma* spp. tienen la capacidad de incrementar el número y longitud de raíces emitidas de estacas de diferentes especies de plantas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta fase, en el que la aplicación del T4 incrementó en un 40% el número de raíces emitidas, en contraste con brotes sin tratamiento alguno (T1), mientras que para la variable longitud de las raíces, se evidenciaron incrementos significativos en los tratamientos T2, T4, T5, T6 comparados con el testigo, siendo incluso el incremento del T5 superior y diferente al resto de los tratamientos. En este sentido Contreras-Cornejo et al. (2009), Hoyos-Carvajal et al. (2009) y Zhang et al. (2013), concuerdan que la promoción del crecimiento radical está ligado a la producción de compuestos auxínicos tales como el AIA, siendo éste responsable de la elongación radical. Aunado a ello, Viterbo et al. (2010), indica que la cepa *T. asperellum* T203 secreta una enzima denominada 1-Aminociclopropano-1-Carboxilato deaminasa (ACCD) al colonizar las raíces, la cual estimula la elongación de las raíces. De acuerdo con Samuels et al. (2010) y Atanasova, Druzhinina & Jaklitsch (2013), esta cepa ha sido recientemente reclasificada como *T. asperelloides* T203.



Figura 7. Efecto de Extractos crudos más biomasa de dos aislados de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento de brotes enraizados a 16 días después del trasplante. A. brotes sin aplicación (T1). B. Brotes con aplicación del aislado MOTrh (T2). C. Brotes con aplicación de T3 (LaBio TD37). D. Brotes con aplicación de la mezcla de los aislados MOTrh+LaBioTD37 (T4).

Figure 7. Effect of Crude extracts and two biomass isolates of *Trichoderma* spp. growth on rooted shoots 16 days after transplantation. A. outbreaks without application (T1). B. Sprouts with isolated application MOTrh (T2). C. buds with application of T3 (lip TD37) . D. Sprouts with applying the mixture of isolated LaBioTD37 MOTrh + (T4).

Asimismo, se evidencia que para las variables antes indicadas existieron diferencias en cuanto al momento y método de aplicación, reflejado por los tratamientos T5 y T6, los cuales demostraron que la aplicación de *Trichoderma* spp desde la fase de enraizamiento mejoró la calidad del sistema radical aún en una etapa posterior a su aplicación. Este efecto es respaldado por Hohmann et al. (2011), quienes al comparar dos métodos de aplicación, de *T. hamatum* LU592 sobre *Pinus radiata*, determinaron diferencias en cuanto al número de raíces.

Además, se ha documentado que especies de *Trichoderma* poseen la capacidad de incrementar la biomasa de cultivos agrícolas, herbáceos, perennes, frutales e incluso especies forestales. (Harman, 2000; Yedidia et al., 2001; Hohmann et al., 2011; Hung, Lee, & Bennet, 2013), lo cual es constatado por los resultados obtenidos en términos de peso fresco. Estos resultados reflejaron que para la parte aérea, se registraron incrementos de 51-55% por parte de los tratamientos T5 y T6, con respecto al tratamiento testigo (T1). Mientras que en el sistema radical, el incremento reportado fue del 67% por el tratamiento T5 y del 50% por el tratamiento T6, ambos en comparación con el tratamiento testigo (T1). Este incremento en biomasa puede ser explicado conforme a lo indicado por Gravel et al. (2007), quienes consideran la promoción de crecimiento por *Trichoderma*

spp. como una combinación sinérgica de múltiples mecanismos de acción.

Estos mismos autores mencionan que entre los mecanismos que pueden influir, se encuentra la producción de sustancias auxínicas, tales como el AIA. Este compuesto es responsable no solo de la formación y elongación radical, sino además de regular los procesos de dominancia apical en la planta (Gravel et al., 2007; Contreras-Cornejo et al., 2009; Hoyos-Carvajal et al., 2009). Asimismo, Martínez-Medina et al. (2011), indican que plantas de melón inoculadas con *T. harzianum*, experimentaron cambios sustanciales en los perfiles hormonales, los cuales están ligados no solo a la producción de compuestos auxínicos, sino además en su transporte, lo que evidencia cambios sustanciales en las cantidades de zeatina, ácido indolacético, así como de ácido abscísico y 1-amino-1-ácidocicloprano, éstos últimos relacionados con los mecanismos de resistencia de las plantas.

Aunado a lo anterior, dentro de los procesos de interacción con las plantas, especies de *Trichoderma* colonizan las raíces e incluso logran penetrar la epidermis hasta las partes más externas del córtex (Yedidia et al., 1999). Según de Souza et al. (2008), Bae et al. (2009) y Chaverri, Gazis & Samuels (2011), algunas especies de acuerdo a su ecología logran incluso establecer estrechas relaciones como endofíticas, lo cual constituye una alternativa de biocontrol de agentes fitopatógenos tanto en suelo como a nivel vascular. Para el caso de melina, esto es trascendental, debido al impacto de enfermedades fungosas, tales como el Síndrome del Síndrome de Muerte de la Corteza a nivel de campo (Arguedas, 2004; Baltodano, 2007), así como la promoción del crecimiento y la inducción a la resistencia frente condiciones de estrés biótico y abiótico.

Durante estos procesos de interacción, Vinale et al. (2008a) y Vinale et al. (2009) indican que algunos metabolitos son secretados al medio, entre ellos el Harzianolide, el 6-pentil- α -pirona (6PP) y el Ácido harziánico, los cuales poseen efecto antibiótico sobre agentes fitopatógenos tales como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Botrytis cinerea*, entre otros (Dodd, Hill, & Stewart, 2000; Rubio et al., 2009; Vinale et al., 2009). De acuerdo con Vinale et al. (2008b) estos metabolitos, a bajas concentraciones, logran incrementar el crecimiento de las plantas en términos de peso seco, lo que se demuestra en los resultados obtenidos sobre esta variable, en la que considerando la parte aérea, el peso seco fue incrementado entre el 51 y el 55% para los tratamientos T5 y T6 en contraste con el tratamiento testigo (T1). Mientras que el peso seco radical fue incrementado por los mismos tratamientos en un rango del 51 al 68% respectivamente, lo cual provee evidencia suficiente de la importancia de incorporar los aislados de *Trichoderma*

spp. evaluados desde los procesos de enraizamiento, permitiendo una mayor calidad y crecimiento de las plántulas, que considerando el periodo de evaluación, esto aumentaría el flujo de producción y por lo tanto la eficiencia en el proceso de propagación.

Conclusiones

Se demostró que la aplicación en forma individual de los aislados MOTrh (T2) y LaBioTD37 (T3), así como su mezcla (T4) evidenciaron un efecto similar al ejercido con el ácido Indolbutírico (hormona enraizante) sobre el número de raíces por brote.

Se determinó en condiciones de minitúnel que la aplicación conjunta del enraizante con los aislados MOTrh (T5) y LaBioTD37 (T6) de *Trichoderma* spp., así como la combinación de éstos (T7), mostraron un efecto sinérgico en la producción de raíces por brote.

En la segunda fase del ensayo, se comprobó que las plántulas de melina crecieron significativamente en altura, al aplicar los tratamientos correspondientes a los aislados LaBio TD37 (T3), MOTrh+ LaBio TD37 dirigido al pellet (T4), MOTrh+ LaBio TD37 dirigido a la base del brote (T5) y MOTrh+ LaBio TD37 dirigido a la base del brote y al pellet (T6), en un rango comprendido entre el 28,5-37,13% con respecto al testigo.

El peso fresco de la parte aérea se incrementó significativamente por los tratamientos correspondientes a los aislados MOTrh+ LaBio TD37 dirigido a la base del brote (T5) y MOTrh+ LaBio TD37 dirigido a la base del brote y al pellet (T6), en un rango de 42,5% al 55% respectivamente sobre el tratamiento testigo.

Los tratamientos que consistieron en la combinación de los aislados MOTrh+ LaBio TD37 dirigido a la base del brote (T5) y MOTrh+ LaBio TD37 dirigido a la base del brote y al pellet (T6), incrementaron el peso fresco del sistema radical, siendo éstos 67-50% respectivamente, superior al indicado por el tratamiento testigo.

Se determinaron incrementos en la biomasa aérea, en términos de peso seco, del 58,92% por parte del tratamiento con la combinación de los aislados MOTrh+ LaBio TD37 dirigido a la base del brote y al pellet (T6) con respecto al testigo.

Se probó que la biomasa radical en términos de materia seca aumentó significativamente entre el 51% y 67,94% por parte de los tratamientos con la combinación de los aislados MOTrh+ LaBio TD37 dirigido a la base del brote (T5) y MOTrh+ LaBio TD37 dirigido a la base del brote y al pellet (T6) respectivamente, con respecto al tratamiento testigo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por el financiamiento otorgado a través del proyecto 5402-1401-1018, así como al programa de Movilidad Estudiantil de la misma institución, por la beca otorgada al primer autor para la realización de una pasantía en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, EMBRAPA Meio Ambiente, Brasil. A Melania Fernández Campos, Bryan Abarca Murillo, asistentes del Laboratorio de Fitopatología y Biocontroladores por su colaboración y dedicación en la ejecución de esta investigación.

Referencias

- Adams, P., De Leij, FAA. & Lynch, J. M. (2007). *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microbial Ecology*, 54, 306-313.
- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology (5ta ed.) California, EEUU. 952 p.
- Arguedas, M. (2004). Problemas Fitosanitarios de la melina (*Gmelina arborea* (Roxb)) en Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 1(2), 1-9.
- Atanasova, L., Druzhinina, I. & Jaklitsch, W. M. (2013). Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. (10-44 pp). In: Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mala Mukeherjee. & Schmoll, M (Eds.), *Trichoderma: biology and applications*. CAB International. London, UK.
- Badilla, Y. y Murillo, O. (2005). Enraizamiento de estacas de especies forestales. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 2(6), 1-6.
- Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnik, R. L. & Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolates DIS 219b promotes growth and delays the onset of drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 11, 3279-3295.
- Baltodano, J. (2007). Bosque, cobertura y uso forestal. Decimotercer informe Estado de la Nación en Desarrollo Humano Sostenible. Recuperado de http://www.estadonacion.or.cr/files/biblioteca_virtual/013/Bosque-recursos-forestales.pdf
- Barrantes, A., y Ugalde, S. (2013). Uso y Aportes de la madera en Costa Rica. Estadísticas 2012. Oficina Nacional Forestal. Recuperado de <http://onfcr.org/article/usuarios-y-apuntes-de-la-madera-en-costa-rica/>
- Björkman, T. (2004). Effect of *Trichoderma* colonization on auxin-mediated regulation of root elongation. *Plant Growth Regulation*, 43, 89-92.
- Chacón, P. y Murillo, O. (2005). Análisis comparativo de la producción de minijardines clonales hidropónicos y jardines clonales en tierra de melina (*Gmelina arborea* Roxb). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 2(6), 1-7.
- Chaverri, P., Gazis, R. & Samuels, G. J. (2011). *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia*, 103(1), 139-151.

- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Cortés-Penagos, C. & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 149, 1579-1592.
- Cubillos-Hinojosa, J., Valero, N. y Mejía, L. (2009). *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, 27(1), 81-86.
- De Souza, J. T., Bailey, B. A., Pomella, A. W. V., Erbe, E. F., Murphy, C. A., Bae, A. & Hebbard, P. K. (2008). Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of witches' broome pathogen, and its influence on plant growth and resistant. *Biological Control*, 46, 36-45.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>
- Dodd, S. L., Hill, R. A. & Stewart, A. (2000). Control of *Athelia rolfsii* on lentil seedlings using 6-pentyl- α -pyrone. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1033-1034.
- Donoso, E., Lobos, G. A. y Rojas, N. (2008). Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Bosque*, 29, 52-57.
- Gravel, V., Antoun, H. & Tweddell, R. J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomatoe plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indolacetic acid IAA. *Soil Biology & Biochemistry*, 37, 1968-1977.
- Harman, G. E. (2000). Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes and Perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*, 84, 373-492.
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96, 190-194.
- Harman, G. E. (2011). *Trichoderma*, not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, 39, 103-108.
- Harman, G. E., Bjorkman, T., Ondik, K. & Soresh, M. (2008). Changing Paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. Outlooks of pest management.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species- an opportunistic, avirulent plant symbionts. *Microbiology*, 2, 43-56.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158, 11.25.
- Hill, R. (2012). *Trichoderma* root endophytes enhance plant health and vigour. In XII International *Trichoderma* & *Gliocladium* Workshop, New Zeland.
- Hohmann, P., Jones, E. E., Hill, R. A. & Stewart, A. (2011). Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially grown seedlings. *Fungal Biology*, 115, 759-767.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4-10.
- Hoyos-Carvajal, Orduz., & Bisset, J. (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, 51, 409-416.
- Hung, R., Lee, S. & Bennet, J. W. (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecology*, 6, 19-26.
- Jiménez, F. M. L. (2003). Estado de la diversidad biológica de los árboles y bosques en Costa Rica. Recursos Genéticos Forestales. FGR/46S Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales, Dirección de Recursos Forestales, FAO, Roma.
- Martínez-Medina, A., Roldán, A., Albacete, A. & Pascual, J. A. (2011). The interaction with arbuscular micorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. *Phytochemistry*, 72, 223-229.
- Mastouri, F., Bjorkman, T. & Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* allivates biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopatology*, 100, 1213-1221.
- Mesén, F. (1998). Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: Uso de propagadores de subirrigación. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba (CATIE), Costa Rica. 36p.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Moya, R. (2003). La Madera de melina (*Gmelina arborea*) en Costa Rica. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/WFC/XII/0591-B4.HTM>
- Mukherjee, M., Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Zachow, C., Berg, G. & Zeilinger, S. (2012). *Trichoderma*-Plant-Pathogen Interactions: advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology*, 52(4), 522-529.
- Murillo, O. (2004). Consultoría: Establecimiento y manejo de Rodales y Huertos Semilleros con el fin de fortalecer la capacidad nacional de producción de material mejorado para la reforestación en Costa Rica. Recuperado de http://www.fonafifo.go.cr/text_files/e_proyectos/S_INF_AV.PDF
- ONF (Oficina Nacional Forestal). (2013). Precios de la madera para las principales especies comercializadas en Costa Rica. Recuperado de http://onfcr.org/media/uploads/documents/precios_de_la_madera_en_cr_y_principales_tendencias_junio_2012.pdf
- Rubio, M. B., Hermosa, R., Reino, J. L., Collado, I. G. & Monte, E. (2009). *Thctf1* transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 17-27.
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M. C., De Respinis, S. & Petrini, O. (2010). *Trichoderma asperellum* sensu lato consist in two cryptic species. *Mycologia*, 102(4), 944-966.
- Serrano-Montero, R. y Moya-Roque, R. (2011). Procesamiento, uso y mercado de la madera en Costa Rica: aspectos históricos y análisis crítico. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 8(21).
- Vinale, F., Ghisalberti, E. L., Flematti, G., Sivasithamparam, K., Lorito, M., Marra, R. & Skelton, B. W. (2009). Harzianic Acid, an antifungal and Plant Growth Promoting Metabolite from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*, 72, 2032-2035.

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo, S. L. & Lorito, M. (2008a). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interaction with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 80-85.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. & Lorito, M. (2008b). *Trichoderma* Plant Pathogen Interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 1-10.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L. & Chet, I. (2010). Characterization of ACC Deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperelum* T203. *FEMS of Microbiology letters*, 305, 42-48.
- Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y. & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum*, on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, 235, 235-242.
- Yedidia, I., Benhamou, N. & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* Appl. *Environ. Microbiol*, 65(3),1061-1070.
- Zeilinger, S. & Schuhmacher, R. (2013). Organic Volatile Metabolites of *Trichoderma* spp.: Biosynthesis, Biology and Analytics. (110-127 pp). In: Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M. & Schmoll, M. (Eds.) *Trichoderma Biology and Applications*, CAB International. London, UK.
- Zhang, F., Shen, Q., Yuan, J., Cui, Y., Chen, L. & Ran, W. (2013). Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization. *Plant Soil*, 368, 433-444.