

# Efectos de la aplicación de *Trichoderma asperellum* y su filtrado en el crecimiento de almácigos de cebolla (*Allium cepa*)

## Effects of the application of *Trichoderma asperellum* and its culture filtrate on the growth of onion seedlings

William Rivera-Méndez<sup>1</sup>, Jaime Brenes-Madriz<sup>2</sup>, Claudia Zúñiga-Vega<sup>3</sup>

---

Fecha de recepción: 30 de julio de 2017

Fecha de aprobación: 19 de setiembre de 2017

Rivera-Méndez, W; Brenes-Madriz, J; Zúñiga-Vega, C.  
Efectos de la aplicación de *Trichoderma asperellum* y su filtrado en el crecimiento de almácigos de cebolla (*Allium cepa*). *Tecnología en Marcha*. Vol. 31-2. Abril-Junio 2018. Pág 98-105.

DOI: 10.18845/tm.v31i2.3627

---

1 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: wirivera@tec.ac.cr.

2 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: jabrenes@tec.ac.cr

3 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: czuniga@tec.ac.cr



## Palabras clave

*Trichoderma asperellum*; filtrados; biocontrol; *Allium cepa*; promoción del crecimiento.

## Resumen

La aplicación de *Trichoderma* spp en el cultivo de la cebolla se ha enfocado principalmente hacia el combate de enfermedades como *Sclerotium cepivorum*, su principal problema fitopatológico. Con la aplicación de biocontroladores se busca, además de reducir el uso de fungicidas químicos, preparar a la planta desde los primeros estadios del almácigo con la aplicación de filtrados, que fortalezcan y colonicen la raíz, brindándole una protección contra el ataque de los patógenos. El objetivo de esta investigación consistió en determinar los efectos de una cepa nativa de *Trichoderma asperellum* y un filtrado de metabolitos secundarios sobre el crecimiento de almácigos de cebolla (*Allium cepa*). La investigación se realizó en dos ciclos de cultivo; uno en el 2015 y otro en el 2016. Se realizaron aplicaciones cada 10 días de los diferentes tratamientos, cada tratamiento consistió de 2 bandejas, cada una con 288 plantas: T 1= *T. asperellum* preparado al 100%, T2= *T. asperellum* preparado al 50%, T3= Producto comercial Vitavax®, T4= Testigo, T5= Filtrado al 100% y T6= Filtrado al 50%. En el 2015 solo se probaron los cuatro primeros tratamientos. Para el 2015, se observó que T1 es el mejor tratamiento, ya que mostró un mayor efecto en la elongación y el peso seco radical, así como en el peso fresco de la raíz y el peso seco aéreo. En la elongación de la raíz para el 2016, los tratamientos de T2, T1 y T6 son los que presentaron los mayores tamaños. Con base en lo observado, el tratamiento del filtrado al 50% tiene los mismos efectos que los tratamientos T1 y T2 en todas las variables.

## Keywords

*Trichoderma asperellum*; filtrates; biocontrol; *Allium cepa*; growth promotion.

## Abstract

The application of *Trichoderma* spp in onion has focused mainly on the fight against diseases such as *Sclerotium cepivorum*, its principal phytopathological problem. With the application of biocontrollers, we seek to reduce the use of chemical fungicides and to prepare the plant from the first stages of the seedbed with the application of culture filtrate that strengthen and colonize the root providing a protection against the attack of pathogens. The objective of this research was to determine the effects of a native strain of *Trichoderma asperellum* and a secondary metabolite culture filtrate on the growth of onion seedlings (*Allium cepa*). The research was made in two different years: 2015 and 2016. Each treatment consisted of 2 trays, each with 288 plants: T 1 = *T. asperellum* prepared at 100%, T2 = *T. asperellum* prepared at 50%, T3 = Vitavax commercial product ®, T4 = Control, T5 = 100% filtered and T6 = 50% filtered. In 2015 were tested only the first four treatments. By 2015, it was observed that T1 is the best treatment, as it showed a greater effect on elongation and dry weight as well as on fresh root weight and aerial dry weight. In the elongation of the root for 2016, the T2, T1 and T6 treatments presented the largest sizes. Based on the observed, treatment of 50% filtrate has the same effects as treatments T1 and T2 in all variables.

## Introducción

*Trichoderma sp* es un hongo que se localiza en muchos tipos de ambientes en todo el mundo. Se usa principalmente como antagonista y micoparásito, de acuerdo con [1] se conocen más de 100 especies. Algunas de ellas promueven el crecimiento, mejoran la absorción de nutrientes, incrementan la tasa de germinación de semillas y la estimulación de las defensas de la planta para lograr una mayor tolerancia a enfermedades y al estrés abiótico. Actualmente ocupa el primer lugar entre los biofungicidas más exitosos en la agricultura, donde más del 60% de los compuestos registrados en el mundo, se obtienen de este género. Hermosa *et al.* [2], Mukherjee *et al.* [3], Shoresh *et al.* [4] han establecido que también interactúa con otros microorganismos de la rizósfera para lograr dicha protección

En general se encuentran muchas cepas de este biocontrolador en la rizosfera, donde son capaces de penetrar y colonizar las raíces, estableciendo simbiosis, que aumentan la inmunidad de las plantas contra la invasión de patógenos e incrementan su actividad fotosintética, el rendimiento y el crecimiento. La evidencia experimental indica que las interacciones de *Trichoderma* con las plantas son similares a la de otros microorganismos benéficos, aunque también presentan sus propias particularidades [2].

Las especies de *Trichoderma* regulan vías metabólicas, como la producción de auxinas que promueven el crecimiento de las raíces; a la fecha, se han obtenido más de 100 compuestos de metabolitos secundarios (MS) de este biocontrolador. Las plantas como respuesta, depositan callosa y sintetizan polifenoles que inciden en el incremento de su respuesta sistémica a los patógenos. También, se ha encontrado que algunas especies son capaces de vivir como endófitas de las plantas y provocar cambios que les permiten responder mejor a las enfermedades y al estrés abiótico [3], [5].

Los hongos producen una amplia gama de metabolitos secundarios (MS), moléculas pequeñas que no son esenciales para el crecimiento, pero que tienen un papel importante en la señalización, el desarrollo y la interacción con otros organismos. En algunos casos, un metabolito “secundario” puede ser indispensable para la supervivencia bajo condiciones ambientales particulares, como los sideróforos, necesarios para el crecimiento a bajas concentraciones de hierro. La abundancia y diversidad de estos compuestos depende de cuáles genes están presentes en el genoma y de las condiciones que inducen su expresión. Algunos genes se expresan por las condiciones abióticas y otros como respuesta a interacciones con otros organismos. Esto podría ser de gran importancia para el biocontrol, donde *Trichoderma* interactúa con los hongos huéspedes y las raíces de las plantas en la rizósfera según Mukherjee [5].

El control biológico por organismos antagonistas es útil y cada vez se utiliza más para la protección de los cultivos. Esta actividad comprende tanto la producción de antibióticos, la competencia por los nutrientes, la inducción de resistencia y la producción de enzimas que degradan la pared del patógeno. *Trichoderma* secreta de enzimas líticas, como las  $\beta$ -1,3 y la  $\beta$ -1,6 glucanasas, quitinasas, con gran potencial para el control de especies de *Sclerotium*, así como quitosanasas y proteasas [6], [7], [8]. También es un hongo promotor del crecimiento de plantas (PGPF) y agente de control biológico. La explotación de la naturaleza diversa de los metabolitos secundarios producidos por sus diferentes especies aumenta su extensa utilidad en la agricultura y otras industrias relacionadas, donde se busca aumentar la comprensión de sus mecanismos de acción contra un gran conjunto de infecciones fúngicas, bacterianas y en algunos casos virales [9].

La aplicación de *Trichoderma* en el cultivo de la cebolla se ha enfocado principalmente hacia el combate de *Sclerotium cepivorum*, su principal problema fitopatológico. Lo que se busca, además de reducir el uso de fungicidas químicos, es preparar a la planta desde los primeros estadios del almácigo con la aplicación de biofiltrados, que fortalezcan y colonicen la raíz,

brindándole una protección contra el ataque de los patógenos. Además de disminuir el impacto ambiental por efecto de residuos tanto en el suelo aire y mantos acuíferos, se pretende dar opciones a los agricultores orgánicos y convencionales. Ante un eventual cambio climático que podría traer consecuencias sobre las interacciones de las plantas y los microorganismos, benéficos y patógenos, adquiere relevancia conocer y aprovechar las interacciones planta-microorganismo para buscar una agricultura más sostenible y determinar el impacto de las condiciones climáticas sobre la agricultura.

Se han hecho aislamientos de cepas de *Trichoderma* nativos muy eficientes como antagonistas y también se están aplicando sus metabolitos secundarios, que son más eficaces y sencillos de manipular. Ortuño y colaboradores [10] indican que la aplicación directa de estos, dará un mayor impulso al uso y aplicación de los biofertilizantes. Se han adaptado numerosas estrategias para desarrollar formulaciones de bioplaguicidas de *Trichoderma* a partir de la biomasa del hongo. Sin embargo, este tipo de productos presenta ciertas desventajas, como el tiempo limitado de los productos en anaquel, necesidad de altas dosis, baja estabilidad en ambientes adversos. Mientras que los MS purificados podrían potencialmente ser más específicos para controlar las enfermedades y plagas, su tiempo útil en el anaquel es mayor y se requieren dosis más bajas [9].

*Trichoderma* es un gran productor de metabolitos secundarios con importancia farmacéutica y biotecnológica que incluyen péptidos no ribosomales, pirones, sideróforos y terpenos volátiles y no volátiles. Además se localiza en la rizosfera, donde se da una intensa comunicación entre las plantas y los microorganismos asociados a través del intercambio y percepción de señales. Recientes investigaciones han mostrado que en las etapas iniciales de interacción, los metabolitos como auxinas y compuestos proteicos liberados por *Trichoderma* son percibidos por las raíces, alterando muchos mecanismos hormonales que controlan el crecimiento de plantas y el desarrollo bajo condiciones normales o de estrés. Como consecuencias, cuando el sistema radicular es colonizado, la asociación se potencia proveyendo protección a la zona contra microorganismos patógenos y también desarrollando más el sistema radicular, lo que mejora la absorción de nutrientes y agua. Lo anterior incrementa la tolerancia al estrés por parte de la planta, promueve el crecimiento vegetal e induce resistencia contra los patógenos [11], [12].

El objetivo de esta investigación consistió en determinar los efectos de una cepa nativa de *Trichoderma asperellum* y un filtrado de metabolitos secundarios sobre el crecimiento de almácigos de cebolla (*Allium cepa*).

## Materiales y métodos

La investigación se realizó durante los años 2015 y 2016. La fase inicial de esta investigación consistió en la inoculación con *T. asperellum* en almácigos de cebolla de la variedad Alvara, los cuales se establecieron en la empresa Villa Plant, ubicada en Dulce Nombre de Cartago. Las semillas se plantaron en bandejas plásticas con capacidad para 288 plantas, se llenaron con una mezcla de sustrato compuesto de 1/3 de abono orgánico, 2/3 de suelo con granza de arroz a razón de 100 g / kg de mezcla, desinfectado previamente con vapor a 80°C. La etapa de almácigo se evaluó durante los 38 días que tardó el periodo de germinación y el desarrollo de las plántulas.

El llenado de las bandejas con sustrato se realizó de forma manual y la siembra con una sembradora mecánica, luego se cubrió con una capa de sustrato y se aplicó cada uno de los tratamientos. Las bandejas se colocaron en un cuarto de germinación a 23°C y con una

humedad relativa del 96%, la primera aplicación de los tratamientos en los almácigos se realizó el día de la siembra.

Se realizaron aplicaciones cada 10 días de los diferentes tratamientos, cada tratamiento consistió de 2 bandejas, cada una con 288 plantas: Para el 2015, los tratamientos fueron: Tratamiento 1= *T. asperellum* preparado al 100%, Tratamiento 2= *T. asperellum* preparado al 50%, Tratamiento 3= Producto comercial Vitavax® y Tratamiento 4= Testigo (cuadro 1).

A los 15 días de sembrado se trasladaron del cuarto de germinación al invernadero, donde se continuó con su crecimiento y las aplicaciones de los distintos tratamientos. A los almácigos se les dio el manejo normal en cuanto a fertilización y control de plagas.

Cuando las plántulas estuvieron listas para ser llevadas al campo, se tomaron 30 por tratamiento y se determinó el efecto de *T. asperellum*. Se hicieron mediciones de peso fresco, seco y longitud de las raíces y área foliar. Para el peso seco se colocaron las muestras a 80°C por 72 horas en una estufa.

Para obtener el *T asperellum* en estado líquido se agregaron 500 gr *T. asperellum* cultivado en sustrato de arroz y se mezcló en 800 ml de agua, en un beaker de vidrio con capacidad de 1 L. Se procedió a restregar manualmente el sustrato de arroz para desprender las esporas del hongo en el agua. Seguidamente se pasó el líquido resultante por un colador de uso convencional, trasvasándose a un beaker con capacidad de 1 L, completando la capacidad del recipiente con 200 ml de agua hasta llegar al punto de aforo. Para esta investigación se usaron 27 ml de *Trichoderma sp* cultivado en sustrato de arroz por cada litro de agua, para la preparación al 100%, y 13.5 ml por cada litro de agua para la preparación al 50%. El tratamiento a base de Vitavax® consistió en la disolución del producto en la cantidad de agua a utilizar, el cual se preparó al momento de usar (cuadro 1).

En el segundo año, se incluyeron dos tratamientos más, se utilizó un filtrado preparado en el Centro de Investigaciones en Biotecnología (CIB), se utilizaron 150ml de caldo papa dextrosa (PDB) con un inóculo de *T. asperellum* para lograr una concentración de  $2,0 \times 10^7$  esporas/ml. Este se incubó en agitación a 100rpm durante 8 días a una temperatura de 28 °C, al cabo de los cuales se filtró mediante papel filtro Wathman #1 y filtro de nitrocelulosa de 0.45µm en un sistema de vacío. Este filtrado se utilizó como fuente de metabolitos secundarios. La dosis del 100% correspondió a 4,5ml/ litro de mezcla de aplicación. Para la dosis del 50% se utilizó 2.25ml del preparado de metabolitos secundarios (cuadro 1). Las aplicaciones de cada uno de los tratamientos se realizaron cada 10 días, hasta concluir con el período correspondiente de crecimiento, según el desarrollo del cultivo.

**Cuadro 1.** Tratamientos utilizados en el almácigo de cebolla. 2015-16

Número	Tratamiento
T1	<i>T. asperellum</i> al 100% (110 g de un preparado de <i>T. asperellum</i> por 3.6 L de agua)
T2	<i>T. asperellum</i> al 50% (55 g de un preparado de <i>T. asperellum</i> por 3.6 L de agua)
T3	Tratamiento con agroquímicos a base de Carboxin® y Captán® como protector radicular (8.5 g del producto disuelto en 3.6 L de agua)
T4	Testigo absoluto, en el cual no se utilizará ningún aditivo para la protección radicular
T5	Filtrado al 100%

T6	Filtrado al 50%
----	-----------------

El *T. asperellum* utilizado en la inoculación en esta fase se colectó de muestras de suelo, de la zona de Llano Grande de Cartago y fue aislado en el Laboratorio de Biocontrol del CIB, Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

## Resultados y discusión

Para el 2015, se observó que T1 es el mejor tratamiento, ya que mostró un mayor efecto en la elongación y el peso seco radical, así como en el peso fresco de la raíz y el peso seco aéreo. Para las otras dos variables que fueron longitud parte aérea y peso fresco aéreo no existieron diferencias significativas con los otros tratamientos (cuadro 2). Dentro de las propiedades de la cepa utilizada de *T. asperellum*, se ha determinado que promueve el desarrollo radicular y protege la raíz, porque genera una mayor biomasa, mediante el desarrollo de raíces secundarias y terciarias. A mayor superficie radical va a ser mayor la absorción de nutrientes, lo que conlleva un mayor crecimiento. Es importante señalar, que los resultados de peso fresco y elongación aérea analizados de forma individual podrían inducir a error, pues el tejido tiene una alta capacidad de absorción de agua, que no necesariamente está asociado con el aumento en proteínas, carbohidratos y productividad. Por lo que el parámetro más fiable es el peso seco, porque realmente está mostrando una indicación de la nueva biomasa generada, lo que trae beneficios a la planta, porque puede realizar más fotosíntesis.

En la elongación de la raíz para el 2016, los tratamientos de T2, T1 y T6 son los que presentaron los mayores tamaños. Si se analiza el tamaño del efecto del crecimiento real de la raíz, el T2 promovió un mayor desarrollo, lo que podría resultar beneficioso para la productividad del cultivo, ya que como se mencionó anteriormente, una mayor área radicular promueve una mayor absorción de nutrientes.

**Cuadro 2.** Comparación entre las variables analizadas y los tratamientos aplicados. 2015-2016

VARIABLE	2015 MEJOR TRATAMIENTO Y MEDIA	P*	2016 MEJOR TRATAMIENTO Y MEDIA	P*
Longitud parte aérea	T4 217.475 mm T3 210.650 T2 203.575	Kruskall wallis P= 9.182e-06	No hubo diferencias entre los tratamientos	ANOVA P= 0.4024
Peso fresco aéreo	T4 1077.5 mg	Kruskall wallis P= 1.497e-12	T2 65.0000 T6 62.66667 T1 61.90000	Kruskall P= 0.0007239
Peso seco aéreo	T1 161.000 mg T4 154.950	Anova P=5.283e-09	T6 120.10000 T1 113.30000	Kruskall P= 2.16e-13
Longitud raíz	T1 4.156136 cm	Anova P= 4.34e-08	T5 2.471741 T1 2.404843 T2 2.377896	ANOVA P= 0.0004177
Peso fresco raíz	T4 243.0 mg T1 208.0 T2 206.0	Kruskall wallis P= 1.497e-12	T6 666.0333 T4 653.6667 T1 604.4000	ANOVA P= 0.0015



Peso seco raíz	T1 103.200 mg	Anova P= 2.989e-14	No hay diferencias entre los tratamientos	ANOVA P= 0.06499
----------------	---------------	-----------------------	--	---------------------

\*P: prueba de significancia. Se aplicó Kruskal wallis o ANOVA según la Normalidad y Homocedasticidad de la muestra

Para las variables medidas durante el 2015, los tratamientos T2 y T1 son los que presentaron los mayores resultados. Como ambos tienen un desempeño parecido, el uso del *Trichoderma* al 50% resulta más beneficioso desde el punto de vista de costos de producción. Este efecto donde una dosis menor de esporas, produce resultados similares que una mayor, ha sido descrito para el género *Trichoderma* por diversos autores y generalmente va asociado a cambios en pH y en los niveles de auxinas [13].

La incorporación en el segundo año de dos tratamientos basados en filtrados de un fermentado de *T. asperellum*, sin ningún tipo de purificación o concentración, se usó para determinar si algún efecto observado en las variables medidas podía ser reproducido sin la necesidad de las esporas del hongo. Con base en lo observado, el tratamiento del filtrado al 50% tiene los mismos efectos que los tratamientos T1 y T2 en todas las variables. Es muy conocido que los metabolitos secundarios y/o las proteínas secretadas por este género de hongo en los filtrados actúan como moléculas promotoras del crecimiento en una gran cantidad de plantas, sobre todo nivel rizosférico [9].

Lo anterior es importante porque indica que los filtrados pueden servir como sustitutos de los productos basados solamente en esporas. A este respecto, una de las tendencias en el desarrollo de nuevos insumos de uso agrícola se basa en el uso de metabolitos como inductores, no solo de respuestas de crecimiento sino también de defensas sistémicas o locales en las plantas frente a un determinado patógeno [14]. Es claro que se debe trabajar en la determinación de los metabolitos que pueden estar interviniendo directamente en la inducción de respuestas en las raíces de *Allium cepa* y en la forma de purificar estos a partir de filtrados crudos para evaluar directamente su efecto y su posible formulación.

## Conclusiones

En síntesis, se determinó para el 2015 que el tratamiento de *Trichoderma asperellum* al 100%, contribuyó con una mejora en la longitud y peso seco de las raíces, lo que brinda una protección adicional contra el ataque de patógenos. Para el 2016 fueron T2, T1 y T6 los que presentaron los mejores resultados para la mayoría de variables medidas, lo que indica que los filtrados causaron los mismos efectos que los tratamientos basados solo en esporas. Es necesario ampliar el trabajo de investigación sobre la identificación, purificación y evaluación de los diferentes metabolitos que pueden estar presentes en un filtrado; y los efectos que puedan tener sobre los tejidos del hospedero y en la relación con los patógenos de ese cultivo. Esto abrirá una puerta para su uso en los programas de control biológico y promoción de crecimiento, sobre todo, ante las limitaciones en la conservación de los insumos que dependen de la biomasa del *Trichoderma*.

## Agradecimientos

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión el financiamiento de esta investigación.

## Referencias

- [1] ICTF. International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy. Available: <http://www.fungaltaxonomy.org> 2016.
- [2] R. Hermosa *et al.*, "Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes". *Microbiology*, vol.158, pp. 17–25, 2012.
- [3] M. Mukherjee *et al.*, "*Trichoderma*–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control". *Indian J. Microbiol.*, vol. 52, pp. 522–529, 2012.
- [4] M. Shores *et al.*, "Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents". *Annu Rev Phytopathol.*, vol. 48, pp. 21–43, 2010.
- [5] P.K. Mukherjee *et al.*, "Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective". *Microbiology*, vol. 158, pp. 35-45, 2012.
- [6] H. Ait-Lahsen *et al.*, "An Antifungal Exo-1, 3-Glucanase (AGN13.1) from the Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum*". *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67 pp. 5833–5839, 2001.
- [7] S. Gruber and V. Seidl-Seiboth, "Self-versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*". *Microbiology*, vol.158, pp. 26–34, 2012.
- [8] L.H.C. Lima *et al.*, "Purification of a chitinase from *Trichoderma* sp. and its action on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls". *Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 43, pp. 31-37, 1997.
- [9] C. Keswani *et al.*, "Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp". *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 98 pp. 533-544, 2014.
- [10] N. Ortuño *et al.*, "Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas". *J Selva Andina Biosph.*, vol. 1 pp. 16-24, 2013.
- [11] H.A. Contreras-Cornejo *et al.*, "Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants". *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 92 pp.1-17, 2016.
- [12] B. Martínez *et al.*, "*Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos". *Rev. Protección Veg.*, vol. 28, pp. 1-11, 2013.
- [13] H. A. Contreras-Cornejo *et al.*, "*Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*". *Plant Physiology*, vol. 149, pp. 1579-1592, 2009.
- [14] M. Lorito and S. L. Woo, "*Trichoderma*: A multi-purpose tool for integrated pest management," in *Principles of Plant-Microbe Interactions*, Lugtenberg B. (eds), Springer, Cham, 2015, pp. 345-353.