

# INMOVILIZACIÓN DE *Trichoderma harzianum* EN HIDROGELES DE QUITOSANO Y SU USO EN TOMATE (*Solanum lycopersicum*)

## Immobilization of *Trichoderma harzianum* on Chitosan Hydrogels and its Use in Tomato (*Solanum lycopersicum*)

Nazario Francisco-Francisco<sup>1</sup>, Hortensia Ortega-Ortiz<sup>2</sup>, Adalberto Benavides-Mendoza<sup>1‡</sup>, Homero Ramírez<sup>1</sup>, Laura Olivia Fuentes-Lara<sup>1</sup> y Valentín Robledo-Torres<sup>1</sup>

### RESUMEN

Fue documentada la inmovilización de *Trichoderma harzianum* en hidrogeles de quitosano y sus efectos en las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero. El experimento se realizó en dos ciclos. En los meses de julio-agosto de 2009 y marzo-abril de 2010. Esta consistió en la germinación de semillas de tomate en macetas con turba como sustrato. Se establecieron 6 tratamientos, estos fueron: dos tratamientos con el *T. harzianum* inmovilizado en los hidrogeles de quitosano aplicado al sustrato a dos dosis (6 y 3 g por kg de sustrato), dos tratamientos con los hidrogeles de quitosano aplicado a las mismas dosis pero sin el hongo, un tratamiento donde se aplicó el hongo en forma de suspensión al sustrato, y un testigo absoluto (solo sustrato). En ambos ciclos se realizaron pruebas de viabilidad de *T. harzianum* en las muestras de sustrato usadas de los tratamientos correspondientes; al momento de la inmovilización y a los 30 y 51 días después de la siembra. Los resultados obtenidos muestran que el crecimiento de los hongos inmovilizados en el primer ciclo fue similar en todos los tratamientos correspondientes, en el segundo ciclo sobresale la superioridad del hongo inmovilizado al mantener por más tiempo una concentración alta de *T. harzianum* (Th). En cuanto a los efectos sobre las plantas de tomate correspondientes a las variables estudiadas, se observó que los tratamientos con el hongo inmovilizado en los hidrogeles producían plantas con menor crecimiento y biomasa vegetal, sin embargo, el contenido mineral de

P, Ca y Cu fue mayor en los tratamientos con la presencia del hongo. No se observó ningún efecto sobre la epidermis foliar, tejido vascular de las hojas, tallos y raíces, y la asimilación de CO<sub>2</sub> ( $P \leq 0.05$ ).

**Palabras clave:** biopolímeros, control biológico.

### SUMMARY

The immobilization of *Trichoderma harzianum* on chitosan hydrogels and their effects on greenhouse tomato plants (*Solanum lycopersicum*) was documented. The experiment was conducted in two cycles. In July-August 2009 and March-April 2010. This consisted in the germination of tomato seeds in pots with turb as substrate. Six treatments were established: two treatments of *T. harzianum* immobilized on chitosan hydrogels applied to two doses (6 and 3 g kg<sup>-1</sup> of substrate), two treatments with chitosan hydrogels applied to the same doses without the fungus, a treatment where the fungus was applied to the substrate as a suspension, and a control (only substrate). In both cycles the viability of *T. harzianum* in the substrate samples used for treatments, at the time of immobilization and 30 and 51 days after sowing was tested. The results show that the growth of fungi immobilized in the first cycle was similar in all treatments, in the second cycle, when the high concentration of *T. harzianum* (Th) was maintained for a longer time, the superiority of the immobilized fungus was evident. In terms of effects on tomato plants of the variables studied, we observed that treatments with the fungus immobilized in the hydrogels produced less plant growth and plant biomass, but the P, Ca, and Cu mineral content was higher in treatments with the presence of fungus. There was no effect on the leaf epidermis, vascular tissue of leaves, stems and roots, or CO<sub>2</sub> assimilation ( $P \leq 0.05$ ).

**Index words:** biopolymers, biological control.

<sup>1</sup> Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923. 25315 Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

<sup>‡</sup> Autor responsable (abenmen@gmail.com)

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Química Aplicada. Blvd. Enrique Reyna 140. 25250 Saltillo, Coahuila, México.

## INTRODUCCIÓN

El uso de los productos biológicos es una alternativa a los químicos convencionales en la agricultura y en auge en los últimos años (Pérez, 2010). En particular los elaborados a base de microorganismos benéficos son los que presentan atractivos beneficios a los cultivos debido a sus múltiples efectos sobre los fitopatógenos (Ibarra *et al.*, 2006). No obstante, se ha visto que el uso de los productos comerciales no ha garantizado mejores resultados en la producción de cultivos en comparación por ejemplo al uso de microorganismos nativos (Elliot *et al.*, 2009), ya que su presencia en el sitio de aplicación depende de varios factores que disminuyen su efectividad como el uso de agroquímicos (Moliszewska, 2001). Actualmente algunas técnicas biotecnológicas como la inmovilización celular y enzimática se han convertido en una herramienta de manejo de los microorganismos y sus subproductos, lo cual permite mantener o mejorar su actividad protegiéndola de los factores adversos (Alvarez *et al.*, 2009). Dichas técnicas pudieran ser aprovechadas en la agricultura (Mahmoud y Helmy, 2009). Por lo general, estas inmovilizaciones se han realizado en materiales de sílice y polímeros sintéticos que son de alto costo; razón por la que se ha limitado su aplicación extensiva en la agricultura. El quitosano es un polímero natural obtenido de la desacetilación de la quitina, el cual se encuentra en gran proporción en el caparazón de los crustáceos (Lamarque *et al.*, 2007). Este biopolímero posee características útiles en la agricultura, como su actividad antimicrobiana y la inducción de las respuestas de defensa de la propia planta (Rabea *et al.*, 2003), el cual también ha mostrado compatibilidad en la inmovilización enzimática dada su versatilidad en las formas físicas disponibles como la formación de geles (Çetinus *et al.*, 2009). Con todo, no existe información relacionada a la inmovilización de microorganismos benéficos en este biopolímero que pueda ser aplicado en la agricultura.

Por otro lado, es bien sabido de la existencia del microorganismo benéfico *T. harzianum*, el cual muestra actividad biológica significativa (Harman *et al.*, 2004) que pudiera tal vez mejorarse para su aplicación agrícola mediante una técnica de inmovilización. Sin embargo, no existe información de los efectos sobre las plantas por parte de microorganismos inmovilizados en soportes activos como el quitosano. Estudios previos demuestran que la inducción de las respuestas de defensa provocados por el *T. harzianum* en plantas de maíz induce cambios

metabólicos y anatómicos marcados (Shoresh y Harman, 2008).

Para contar con información en este campo, el objetivo del presente trabajo fue documentar la inmovilización del hongo *T. harzianum* en hidrogeles de quitosano como una alternativa para conservar su actividad al aplicarse al sustrato. Se verificó el efecto del microorganismo inmovilizado sobre el crecimiento, absorción de minerales, epidermis foliar, tejido vascular de hojas, raíz y tallo, así como sobre la asimilación de CO<sub>2</sub> en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en condiciones de invernadero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció en dos ciclos diferentes, uno en los meses de julio-agosto del 2009 y otro en los meses de marzo-abril de 2010. La síntesis de los hidrogeles de quitosano (Cs) y la inmovilización del *T. harzianum* (Th) fueron realizados en el departamento de Agroplásticos del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) de Saltillo, Coahuila, México. Las pruebas biológicas con las plantas de tomate se realizaron en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) de Saltillo, Coahuila, México.

### Preparación de Reactivos y del Material Biológico

Los materiales utilizados en ambos ciclos fueron quitosano (Cs) grado técnico marca Marine Chemicals con un peso molecular viscosimétrico de 200 000, el cual se determinó en un viscosímetro tipo Ubbelohde, y un 87% de desacetilación determinado por infrarrojo (Brugnerotto, 2001). Se usó una cepa experimental de *T. harzianum* (Th) aislada de una huerta de nogal del municipio de San Pedro Las Colonias, Coahuila, México, cedida por el Departamento de Parasitología de la UAAAN. Los microorganismos se manejaron a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC. Esta cepa fue reactivada en Papa-dextrosa-agar (PDA) marca Bioxon. Se utilizaron semillas certificadas de tomate cv. Río Grande (SEMINIS) de hábito determinado tipo saladette. Estas fueron sembradas en un invernadero tipo túnel.

El Cs inicialmente fue purificado a partir de una solución al 2% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v), precipitado con NaOH, filtrado y lavado con etanol. La síntesis de los hidrogeles se hizo a partir de una solución al 2% (m/v) del Cs purificado en ácido acético al 1% (v/v), después se entrecruzó con glutaraldehído

al 50% en solución acuosa, y por último se secaron los geles a 60 °C en estufa de aire circulante por 24 h. Los geles se dejan hinchar en agua, se secan y se pesan en ambos casos para determinar el porcentaje de hinchamiento con la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{(Ph - Ps)}{Ps} \times 100$$

donde:

%H = porcentaje de hinchamiento

Ph = peso del hidrogel hinchado

Ps = peso del hidrogel seco

### Inmovilización de *T. harzianum* y Establecimiento del Experimento

La inmovilización del *T. harzianum* se realizó de la siguiente manera: se colocaron en 5g de gel seco en matraces erlenmeyer con 100 mL de caldo de papa y dextrosa previamente esterilizados en autoclave a 120 °C, posteriormente se agregó una alícuota de 1 mL de una suspensión de la cepa con una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC y finalmente fueron incubados por 72 h a 28 °C con agitación constante.

En el verano de 2009 se sembraron las semillas de tomate en invernadero. Para la siembra se utilizaron por tratamiento 20 macetas de polietileno color negro con capacidad de 0.5 kg. Las plantas fueron regadas cada 3 días con una solución nutritiva Douglas completa (Douglas, 1976). Se establecieron 6 tratamientos, éstos consistieron en dos tratamientos con *T. harzianum* inmovilizado en los hidrogeles de quitosano, los cuales fueron aplicados en dosis de 6 y 3 g por kg de sustrato (T1: P + 6gH + Th y T2: P + 3gH + Th); dos tratamientos con los hidrogeles de quitosano a las mismas dosis pero sin el hongo (T3: P + 6gH y T4: P + 3gH); un tratamiento donde se aplicó el hongo en forma de suspensión (T5: P + Ths), el cual fue preparado al mezclar el contenido de 3 cajas petri en 3.5 L de agua corriente y distribuido el contenido en las 20 macetas correspondientes al tratamiento, conservándose la misma concentración antes mencionada de  $1 \times 10^9$  UFC en cada una de las macetas y un testigo absoluto donde sólo está la turba (T6: P). Las variables evaluadas fueron: crecimiento (longitud y diámetro de tallos y número de hojas); biomasa vegetal (peso seco y fresco); anatomía

de hojas, tallo y raíz; epidermis foliar; y contenido de minerales en materia seca.

### Longitud y Diámetro de Tallos y Número de Hojas

La medición de la longitud de los tallos se tomó a los 20, 27, y 34 días después de la siembra (dds). Esta se realizó desde la base del tallo hasta el ápice. La medición del diámetro de los tallos y el conteo de las hojas se efectuó a los 20 y 34 dds. La medición del diámetro se realizó con un vernier ajustándola a la parte media del tallo.

### Biomasa Fresca y Seca (Aérea y Radical)

Para medir esta variable se colectaron 3 plantas al azar de cada tratamiento a los 30 y 40 dds. La raíz se separó de la parte aérea, se pesó por separado y se secó en una estufa a 60 °C durante 24 h. Las muestras se almacenaron para un posterior uso.

### Tejido Vascular de Raíz, Tallo y Hojas

Se realizó un estudio del tejido vascular de la raíz, tallo y las hojas. Para ello se tomaron 2 plantas por tratamiento al azar, a las cuales se les extrajeron 3 secciones tanto de la raíz, el tallo y las láminas foliares, a los 42 dds. Las secciones radicales de 1 cm fueron las ubicadas en la parte más cercana al tallo. Las secciones de tallo de 1 cm fueron las ubicadas en la parte más cercana a la raíz. Las láminas foliares muestreadas se ubicaron en la parte media de las hojas a dos tercios de altura de la planta, las secciones extraídas incluyeron un área de 1.5 cm<sup>2</sup> de la región media de las nervaduras. Una vez extraídos los tejidos, se colocaron en mezcla fijadora de alcohol, ácido acético y formaldehído en una relación 18:1:1, seguido por la deshidratación en mezclas de xilol y alcohol a concentraciones 1:3, 1:1, y 3:1 sucesivamente, y se incluyeron en parafina. Las inclusiones en parafina se realizaron en placas de papel aluminio, de la cual se tomaron los moldes para realizar los cortes en un microtomo de rotación, el grosor de los cortes fue de 20 micras. Los cortes finos fueron colocados en portaobjetos, los cuales fueron sumergidos en 3 mezclas de alcohol (al 70, 96, y 100%) y posteriormente en xilol, carbol xilol, verde rápido y safranina. Por último se analizaron en microscopio VistaVision a 40x con cámara digital (Pixera) integrada. En esta se realizaron mediciones del área vascular

transversal, el cual fue expresado en porcentaje con respecto al resto de los tejidos; diámetro y área perimetral de los vasos del xilema, el cual se reportó en  $\mu\text{m}^2$ . Estas mediciones se realizaron con la ayuda del programa AxioVision 4.5.

### **Epidermis Foliar (Índice y Frecuencia Estomática)**

Se analizó el arreglo de los estomas para cuantificar el índice y la frecuencia estomática. Los folíolos muestreados estaban ubicados en la parte media de las hojas a 2 tercios de altura de la planta. Las muestras se tomaron en una sola fecha, a los 35 dds, con la impresión de 3 folíolos de 3 plantas por tratamiento tomadas al azar. La impresión foliar se realizó colocando pegamento para PVC con una brocha en la cara abaxial y adaxial de cada hoja, colocando cinta adhesiva transparente sobre la película formada sobre la epidermis foliar y después se colocó ésta en un portaobjetos. Para esta variable se utilizó un microscopio VistaVision a 40x de objetivo.

### **Concentración Mineral**

Se determinó la concentración mineral de las plantas a los 44 y 51 dds tomando 3 plantas al azar por cada tratamiento. La determinación de N se realizó por el método macrokjeldahl, el P por colorimetría y los metales Ca, Mg, K, Na, Cu, Z, Mn, y Fe por absorción atómica en un espectrofotómetro Varian AA1275.

En los meses de marzo-abril del 2010 se establecieron los mismos tratamientos que en el primer ciclo con 3 macetas por tratamiento, los cuales se manejaron bajo las mismas condiciones. Este ciclo se estableció sólo para medir la variable asimilación de  $\text{CO}_2$ . Para ello se utilizó el equipo LI-COR Li-6400 Portable Photosynthesis System, los datos tomados fueron: asimilación de  $\text{CO}_2$  en  $\text{mmol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; conductancia estomática en  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; concentración intracelular de  $\text{CO}_2$  en  $\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ; y transpiración en  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Las lecturas se realizaron a los 30 dds, para ello se ensayaron 3 repeticiones a cada tratamiento en un período de luminosidad de tiempo de 11:00 a 13:00.

### **Pruebas de Viabilidad de *T. harzianum* y Análisis Estadístico**

Con el objetivo de verificar la viabilidad y el crecimiento del hongo inmovilizado en los hidrogeles

mezclados con la turba, para ambos ciclos (verano de 2009 y primavera de 2010) se hicieron pruebas a los 30 y 51 dds. Para ello se extrajeron muestras de suelo (1 g) de cada tratamiento donde se adicionó el hongo y se hicieron diluciones seriadas, las cuales se sembraron de  $10^1$  a  $10^6$  en PDA para poder hacer el conteo de las colonias.

Las variables de crecimiento arriba mencionadas fueron evaluadas bajo un análisis de varianza de una y dos vías. Se realizó la prueba de medias con Tukey al 0.05, para ello se utilizó el programa estadístico JMP (SAS Institute, 2002).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Caracterización de los Hidrogeles de Quitosano e Inmovilización de *Trichoderma harzianum***

Se obtuvieron hidrogeles de Cs con un porcentaje de hinchamiento del 500%, los cuales eran fácilmente desmenuzables, no se deformaban con facilidad y no se incrustaban a las superficies así como en las manos, la humedad fue adecuada para el almacenamiento en envases cerrados (humedad recomendable próxima al 4%). El empleo de otros entrecruzantes como el formaldehído (Singh *et al.*, 2006), o adicionando otros reactivos como el polivinil-alcohol pueden mejorar el hinchamiento y la absorción de agua (Gunasekarán *et al.*, 2006). No obstante se ha reconocido que la presencia de reactivos (glutaraldehído, disocianato de tolueno) usados para lograr un mayor entrecruzamiento, contribuye al detrimento en el crecimiento de las células de los microorganismos (Bickerstaff, 1997), por lo que en este trabajo se minimizó en lo posible el uso de reactivos en la formación del hidrogel.

A las 72 horas de haber inmovilizado al *T. harzianum* se observó una coloración verde-oscuro, característica del crecimiento del hongo, comprobándose así su inmovilización en el Cs y alcanzando una concentración de  $10^9$  UFC. Al respecto, Abou-Sereih (2007) observó que aplicando Cs en forma líquida a diferentes concentraciones (de 0 a  $4.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a cepas de Th el crecimiento lineal disminuía conforme se aumentaba la dosis, situación que no se presentó en este experimento con el uso de Cs en forma sólida y a dos dosis diferentes.

Asimismo, se comprobó la presencia de *T. harzianum* a los 30 y 51 dds del cultivo en ambos experimentos verano de 2009 y primavera de 2010 (Cuadro 1). En la colección de los sustratos del 2009,

**Cuadro 1. Unidades formadoras de crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* (Th) en 1 g de las muestras de suelo donde se sembraron semillas de tomate.**

Muestras de suelo <sup>†</sup>	30 días después de la siembra		51 días después de la siembra	
	Julio-Agosto 2009	Marzo-Abril 2010	Julio-Agosto 2009	Marzo-Abril 2010
	----- UFC -----			
T1: P + 6gH + Th	Th a $10^3$	Th a $5 \times 10^5$	Th a $10^1$	Th a $4 \times 10^3$
T2: P + 3gH + Th	Th a $10^3$	Th a $1 \times 10^6$	Th a $10^1$	No hay presencia
T5: P + Th	Th a $10^3$	Th a $5 \times 10^4$	Th a $10^1$	No hay presencia

<sup>†</sup> T1 y T2: muestras donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosano. T5: muestras donde *T. harzianum* fue aplicado en forma de suspensión libre; P = turba; H = hidrogel.

*Th* se encontraba en una concentración similar en los tratamientos que contenían el hongo inmovilizado o en forma libre, con una tendencia a la disminución conforme pasaba el tiempo. En las muestras recolectadas en abril de 2010 se observó la misma tendencia a la disminución, sin embargo, a los 30 dds en las muestras del tratamiento T1 y T2 (hongos inmovilizados) había mayor concentración en comparación al tratamiento T5 (aplicación del hongo en forma libre), lo que indica que hasta este tiempo sobreviven mayor cantidad de colonias del hongo en el hidrogel que los aplicados libremente (Cuadro 1).

En las observaciones a los 51 dds del 2010 se encontró que el *T. harzianum* en el tratamiento T1 se mantenía aún en una concentración alta, sin embargo, en el tratamiento T2 ya no estaba presente ni en la aplicación en forma de suspensión (T5), probablemente debido a las condiciones adversas para el crecimiento del mismo, como el pH del sustrato o la presencia de sales y posiblemente a la presencia de una bacteria fluorescente detectada en el medio haya sido más competitiva y no le haya permitido desarrollarse adecuadamente. Al respecto, Pastucha (2005) observó que aplicando gel de quitosano en suelos cultivados con soya, la composición cualitativa y cuantitativa de los hongos y bacterias presentes aumentaba, también notó que la presencia de bacterias atenuaba la presencia de los hongos, destacando en ellos el aumento de poblaciones benéficas. Sobre esto, no existen estudios detallados que expliquen por qué el mayor desarrollo de las bacterias es acompañado por un pobre desarrollo de los hongos, sin embargo, se ha reconocido que las comunidades microbianas se encuentran en una proporción definida (Myskow 1989), esto quiere decir que la multiplicación intensiva de bacterias está

acompañada por un pobre desarrollo de hongos y viceversa. Por otra parte, Boer *et al.* (2003) indicaron que la composición de la comunidad bacteriana (como las *Pseudomonas*) puede ser un factor determinante en el desarrollo de la fungistasis en *T. harzianum*. Este fenómeno es atribuido a factores bióticos estrechamente ligados a la alcalinidad.

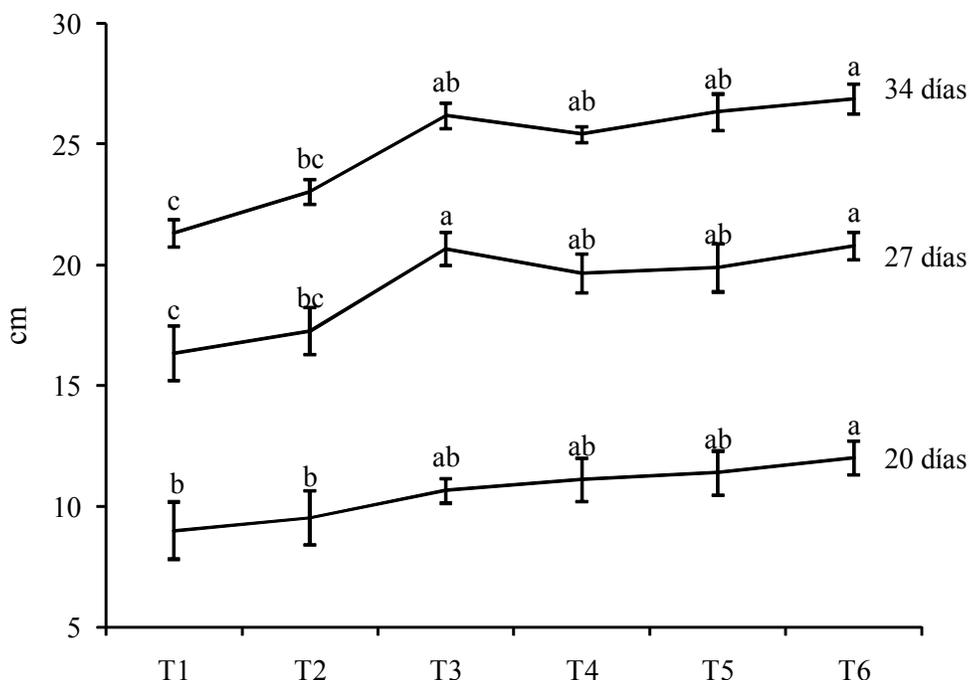
La inmovilización de *T. harzianum* también ha sido probada exitosamente por encapsulamiento en alginato, en el que se ha observado además que el hongo mejora su actividad enzimática comparada con la forma de suspensión (El-Katatny *et al.*, 2003), sin embargo, el alginato como soporte presenta la desventaja de poseer baja estabilidad ante los componentes de los medios de cultivo como el fosfato y citrato (Aguilar-May *et al.*, 2007).

### Variables de Crecimiento y Biomasa Vegetal

Al realizar el análisis de varianza a las variables de crecimiento, la longitud de los tallos mostró diferencia altamente significativa, en la que resalta el efecto de disminución en la altura de las plantas en los tratamientos donde se aplicó el hidrogel con el hongo inmovilizado (T1 y T2), efecto que se marca conforme pasa el tiempo (Figura 1).

Para el caso del número de hojas, el análisis de varianza mostró significancia. En ésta no se observó una clara tendencia a la disminución en estos mismos tratamientos. El diámetro de los tallos presentó menor grosor en el día 20, pero en el día 34 no mostró diferencia con respecto a los demás tratamientos (Cuadro 2).

En la variable biomasa vegetal, solo el peso fresco y seco aéreos mostraron diferencia significativa. La prueba de medias mostró que T1 produce una menor



**Figura 1. Longitud de tallos en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en los diferentes tratamientos con *Trichoderma harzianum* o hidrogeles de quitosano.** Medias ( $\pm$  EE) con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey  $P \leq 0.05$ ). T1 y T2: aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmobilizado en los hidrogeles de quitosano. T3 y T4: aplicación solo de hidrogeles de quitosano. T5: aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: testigo.

biomasa (Cuadro 3). Estas respuestas muestran ser contrarias a los efectos producidos en otras plantas usando sólo *T. harzianum* (Mackenzie *et al.*, 1995), en la que la respuesta común es el aumento en el crecimiento; al igual que el uso de Cs en sus distintas formas de aplicación, donde también mostró ser estimulador en el crecimiento vegetal (Nge *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2008). Sin embargo, no fue el caso en este experimento.

### Estudio de la Epidermis Foliar y del Tejido Vascular de Raíz, Tallo y Hojas

En los estudios de frecuencia e índice estomáticos no se observó diferencia estadística (Cuadro 4). En los estudios anatómicos de los haces vasculares tampoco se observa efecto alguno, el tamaño y la forma de los vasos de xilema fueron similares en todos los tratamientos.

**Cuadro 2. Variables de crecimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en los diferentes tratamientos con *Trichoderma harzianum* (Th) o hidrogeles de quitosano.**

Tratamientos <sup>†</sup>	Número de hojas		Diámetro de tallos (mm)	
	20 días	34 días	20 días	34 días
T1) P + 6gH + Th	*6.10 b	7.84 a	3.75 b	5.11 a
T2) P + 3gH + Th	6.15 ab	6.63 b	3.93 b	5.18 a
T3) P + 6gH	6.36 ab	7.42 ab	4.34 ab	5.14 a
T4) P + 3gH	6.68 ab	7.73 a	4.33 ab	5.33 a
T5) P + Th	6.89 ab	7.73 a	4.19 ab	5.15 a
T6) P	7.05 a	7.78 a	4.75 a	5.43 a
CV	14.50%	13.50%	18.90%	13.90%

\* Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey  $P \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>T1 y T2: aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmobilizado en los hidrogeles de quitosano. T3 y T4: aplicación solo de hidrogeles de quitosano. T5: aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: testigo. P = turba; H = hidrogel.

**Cuadro 3. Producción de biomasa vegetal en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en los diferentes tratamientos de *Trichoderma harzianum* (Th) o hidrogeles de quitosano.**

Tratamientos <sup>†</sup>	Peso fresco radicular	Peso seco radicular	Peso fresco aéreo	Peso seco aéreo
	----- g planta <sup>-1</sup> -----			
T1) P + 6gH + Th	4.09 a*	0.50 a	20.20 b	2.86 b
T2) P + 3gH + Th	4.57 a	0.58 a	23.81 ab	3.44 ab
T3) P + 6gH	5.36 a	0.61 a	23.92 ab	3.47 ab
T4) P + 3gH	5.12 a	0.63 a	22.62 ab	3.57 ab
T5) P + Th	4.87 a	0.65 a	25.46 ab	3.69 ab
T6) P	6.10 a	0.70 a	29.74 a	4.04 a
CV	43.00%	34.20%	19.00%	21.00%

\* Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey  $P \leq 0.05$ ). <sup>†</sup> T1 y T2: aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosano. T3 y T4: aplicación solo de hidrogeles de quitosano. T5: aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: testigo. PFR: Peso Fresco Radicular. PSR: Peso Seco Radicular. PFA: Peso Fresco Aéreo. PSA: Peso Seco Aéreo. P = turba; H = hidrogel.

Contrario a estos resultados, la aplicación foliar de quitosano ha mostrado la habilidad de reducir la transpiración de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*) aumentando el uso eficiente del agua, a través del cierre parcial o total de los estomas (Bittelli *et al.*, 2001). También se ha documentado que *T. harzianum*, como inductor de resistencia sistémica, induce grandes cambios estructurales a nivel celular en las plantas de pepino (*Cucumis sativus*) cuando los hongos colonizan las raíces (Yedidia *et al.*, 1999). Sin embargo, en estos estudios no se encontró modificación alguna (Figura 2).

### Concentración Nutricional

El análisis de la concentración mineral en la materia seca, muestra que solamente existió diferencia

significativa en P, Ca y Cu (Cuadro 5). En general, el tratamiento (T1) donde se tenía la presencia del hongo inmovilizado a mayor dosis de hidrogel fue la que mostró una alta concentración de estos minerales respecto al resto de los tratamientos. Una explicación posible a este hecho es la habilidad del hongo *T. harzianum* para solubilizar minerales como el P, Mn, Fe, y Cu (Altomare *et al.*, 1999). Por otro lado, el Cs presenta propiedades de quelación, intercambio iónico y adsorción de iones (Cartaya *et al.*, 2009) que pudieran también explicar la mayor acumulación de minerales cuando se dispone de mayor cantidad cerca del área radicular. No se observó sin embargo diferencia estadística entre los tratamientos T3 y T4, correspondientes a los efectos de las dosis de hidrogel de Cs, lo que pudiera indicar un efecto sinérgico entre el material de soporte y los hongos.

**Cuadro 4. Tejido vascular de la raíz, el tallo y las hojas a los 42 días y de la epidermis foliar a los 35 días en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en los diferentes tratamientos con *Trichoderma harzianum* (Th) o quitosano.**

Tratamiento <sup>†</sup>	Área vascular transversal	Área perimetral de vasos del xilema	Diámetro de vasos del xilema	Índice estomático	Frecuencia estomática
	%	$\mu\text{m}^2$	$\mu\text{m}$	%	Estomas $\text{mm}^{-2}$
T1: P + 6gH + Th	27.42 a*	1816.23 a	35.42 a	16.92 a	146.8 a
T2: P + 3gH + Th	28.36 a	1712.22 a	40.27 a	16.93 a	149.2 a
T3: P + 6gH	26.20 a	1991.62 a	41.40 a	17.65 a	136.2 a
T4: P + 3gH	30.99 a	1953.46 a	43.85 a	15.51 a	157.8 a
T5: P + Th	28.71 a	1977.57 a	41.95 a	18.38 a	187.8 a
T6: P	30.98 a	2151.21 a	42.39 a	17.71 a	163.0 a
CV	16.20%	16.60%	12.40%	12.50%	22.00%

\* Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey  $P \leq 0.05$ ). <sup>†</sup> T1 y T2: aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosano. T3 y T4: aplicación solo de hidrogeles de quitosano. T5: aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: testigo. P = turba; H = hidrogel.

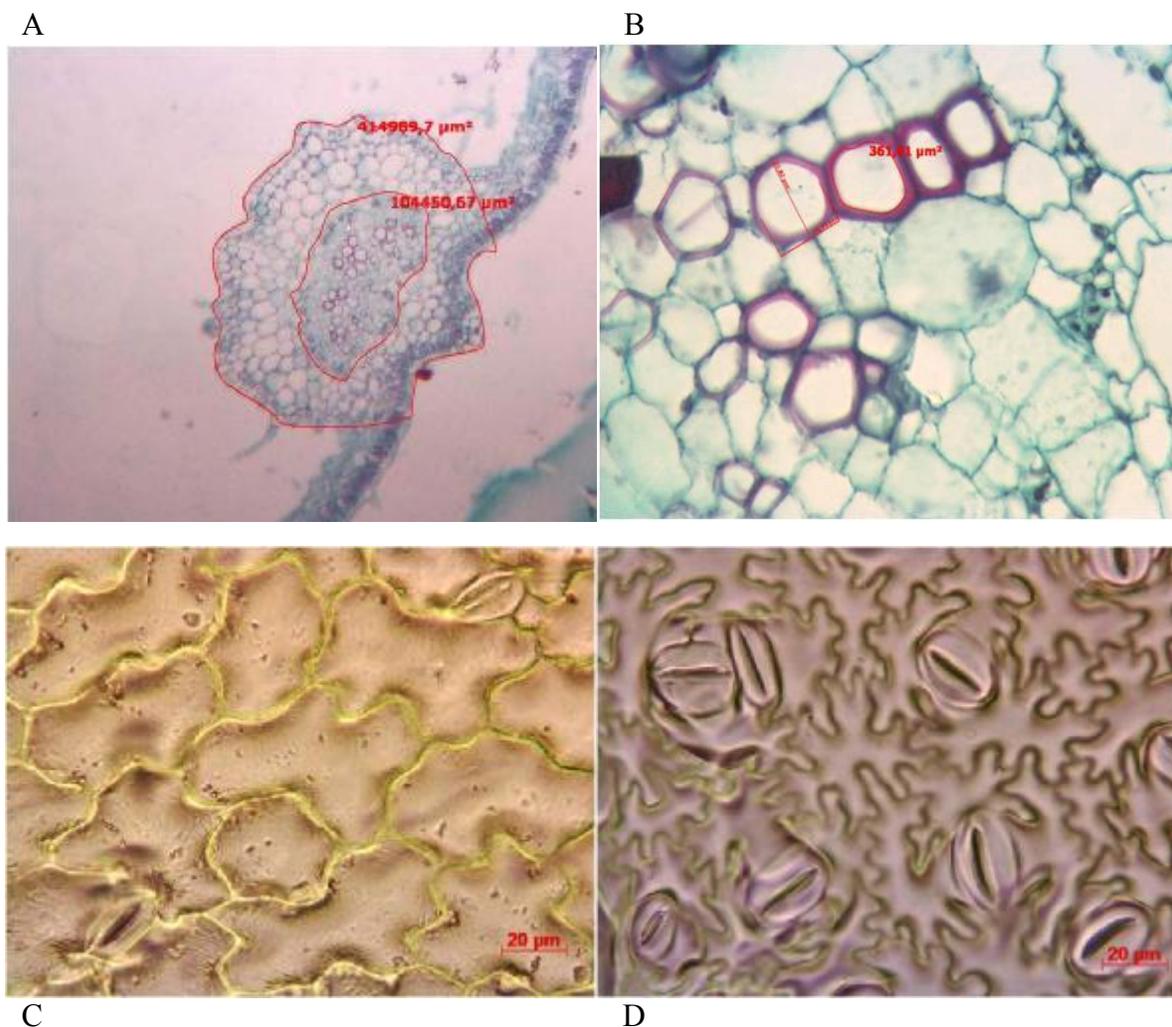


Figura 2. Mediciones de tejido foliar de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) establecidas en turba donde se aplicó la dosis de 6 g de hidrogel con el *T. harzianum*. A: Área de haces vasculares en una sección transversal foliar (xilema y floema) a 10x. B: Área perimetral y diámetro unitario de vasos del xilema (metaxilema y protoxilema) de hojas a 40x. C y D: Haz y envés de foliolos a 40x.

### Asimilación de CO<sub>2</sub>

No se observó diferencia estadística en ninguna de las mediciones de la variable asimilación de CO<sub>2</sub> (Cuadro 6). Estudios previos muestran que el Cs usado como película de recubrimiento foliar en algunas especies de plantas ocasiona una reducción en la fotosíntesis al inicio de la aplicación, pero en los días sucesivos ésta aumenta en comparación a las plantas no tratadas, debido quizá el aumento en la eficiencia en la asimilación de CO<sub>2</sub> (Khan *et al.*, 2002); el cual no está completamente entendido.

Por otro lado, Shores y Harman (2008) observaron que una cepa de Th producía grandes cambios en

el proteoma de plántulas de maíz (*Zea mays*) cuando ésta estaba presente solo en la raíz, sobreexpresando proteínas foliares y disminuyendo la expresión de las de la raíz, a juicio de estos mismos autores, estos costos metabólicos relacionados en la resistencia inducida propiciarían un aumento en la tasa respiratoria y fotosintética. Sin embargo, en este trabajo la complementación de estos mecanismos no afectó las variables en cuestión.

A diferencia de otros trabajos en la que se reportan grandes beneficios en el crecimiento y desarrollo de las plantas por *Trichoderma* (Ozbay y Newman, 2004; Cho *et al.*, 2008), en este trabajo no se observaron diferencias frente a las plantas del tratamiento testigo en la mayoría

**Cuadro 5. Concentración mineral con base en materia seca en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en los diferentes tratamientos con *Trichoderma harzianum* (Th) o hidrogeles de quitosano.**

Tratamiento <sup>†</sup>	N	P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	Mn	Fe	Na
	----- % -----					----- mg kg <sup>-1</sup> -----				
T1: P + 6gH + Th	2.9a	0.15 a*	2.1 a	0.70 a	0.14 a	8.0 a	74 a	60. a	409 a	0.8 a
T2: P + 3gH + Th	2.6a	0.12 ab	2.2 a	0.54 ab	0.12 a	3.6 abc	72 a	58 a	283 a	0.7 a
T3: P + 6gH	2.9a	0.13 ab	1.9 a	0.45 b	0.12 a	2.0 c	62 a	66 a	246 a	0.6 a
T4: P + 3gH	2.3a	0.12 b	2.4 a	0.56 ab	0.13 a	2.5 bc	67 a	52 a	317 a	0.7 a
T5: P + Th	2.9a	0.13 ab	2.5 a	0.66 ab	0.14 a	7.0 ab	90 a	53 a	354 a	0.8 a
T6: P	2.7a	0.11 b	1.9 a	0.47 ab	0.10 a	1.0 c	67 a	52 a	225 a	0.7 a
CV	13%	17%	20%	26.90%	33.80%	34.90%	39.60%	29.70%	72.70%	27.70%

\* Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey  $P \leq 0.05$ ). <sup>†</sup> T1 y T2: aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosano. T3 y T4: aplicación solo de hidrogeles de quitosano. T5: aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: testigo. P = turba; H = hidrogel.

de las variables medidas; incluso aún se obtuvo un menor crecimiento de las plantas. Rabeendran *et al.* (2000) indican que en presencia de condiciones adecuadas de crecimiento será más difícil observar el beneficio de la aplicación de *Trichoderma*, a diferencia del crecimiento en condiciones subóptimas donde si se observan efectos benéficos. Por su parte Koch (2001) menciona que es posible, en una misma especie, obtener resultados positivos en algunos cultivares pero negativos en otros, e inclusive en *Trichoderma* puede encontrarse variación entre cepas, como la mencionada por Ousley *et al.* (1993) quien reportó que algunas cepas del hongo producen metabolitos fitotóxicos que reducen la capacidad germinativa de las semillas. Aunado a esto, no existe una revisión profunda de cuál es el comportamiento de los agentes de biocontrol con las plantas en ausencia de fitopatógenos (Koch, 2001).

## CONCLUSIONES

Es posible la inmovilización de *Trichoderma harzianum* en hidrogeles de quitosano, el cual presenta una viabilidad superior en los hidrogeles comparada al uso en forma de suspensión. Por otra parte, en los tratamientos donde estuvo presente este hongo inmovilizado propició un efecto de detención en el crecimiento longitudinal y una menor producción de biomasa en las plantas, pero se detectó un mayor contenido de minerales y no se observó efecto sobre la anatomía vascular, estomática, y de la actividad fotosintética en las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Esta investigación brinda la posibilidad de implementar una forma de manejo viable de los microorganismos benéficos en la producción de cultivos bajo condiciones de invernadero.

**Cuadro 6. Variables fotosintéticas en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en diferentes tratamientos con *Trichoderma harzianum* (Th) o hidrogeles de quitosano.**

Tratamiento <sup>†</sup>	Tasa fotosintética	Conductancia	CO <sub>2</sub> intracelular	Transpiración
	mmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	mmol CO <sub>2</sub> mol <sup>-1</sup>	mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>
T1: P + 6gH + Th	10.72 a*	0.46 a	282.5 a	15.06 a
T2: P + 3gH + Th	10.11 a	0.55 a	289.2 a	16.18 a
T3: P + 6gH	10.26 a	0.44 a	280.0 a	14.12 a
T4: P + 3gH	10.26 a	0.53 a	286.9 a	16.23 a
T5: P + Th	10.27 a	0.48 a	276.2 a	14.88 a
T6: P	10.73 a	0.48 a	271.0 a	14.27 a
CV	9.90%	36.60%	7.50%	15.30%

\* Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey  $P \leq 0.05$ ). <sup>†</sup> T1 y T2: aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosano. T3 y T4: aplicación solo de hidrogeles de quitosano. T5: aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: testigo. P = turba; H = hidrogel.

## LITERATURA CITADA

- Abou-Sereih, A. N., S. K. H. Abd-El-Aal, and A. F. Sahab. 2007. The Mutagenic Activity of Chitosan and its Effect on the Growth of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* F. Sp. *Sesami*. J. Appl. Sci. Res. 3: 450-455.
- Aguilar-May, B., M. P. Sánchez-Saavedra, J. Lizardi, and D. Voltolina. 2007. Growth of *Synechococcus* s.p. immobilized in chitosan with different times of contact with NaOH. J. Appl. Phycology 19: 181-183.
- Altomare, C., W. A. Norvell, T. Björkman, and G. E. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2926-2933.
- Alvarez, G. S., M. L. Foglia, G. J. Copello, M. F. Desimone, and L. E. Díaz. 2009. Effect of various parameters on viability and growth of bacteria immobilized in sol-gel-derived silica matrices Appl. Microbiol. Biotechnol. 82: 639-646.
- Bickerstaff, G. F. 1997. Methods in biotechnology, immobilization of enzymes and cells. Humana Press. Totowa, NJ, USA.
- Bittelli, M., M. Flury, G. S. Campbell, and E. J. Nichols. 2001. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. Agric. For. Meteorol. 107: 167-175.
- Boer, W., P. Verheggen, P. J. A. Klein Gunnewiek, G. A. Kowalchuk, and J. A. Van-Veen. 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. Appl. Environ. Microbiol. 69: 835-844.
- Brugnerotto, J., J. Lizardi, F. M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrieres, and M. Rinaudo. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Polymer 42: 3569-3580.
- Cartaya, O., C. Peniche e I. Reynaldo. 2009. Polímeros naturales recolectores de iones metálicos. Rev. Iberoamer. Polímeros 10: 81-94.
- Çetinus, S. A., E. Sahin, and D. Saraydin. 2009. Preparation of Cu(II) adsorbed chitosan beads for catalase immobilization. Food Chem. 114: 962-969.
- Cho, M. H., H. K. No, and W. Prinyawiwatkul. 2008. Chitosan treatments affect growth and selected quality of sunflower sprouts. J. Food Sci. 73: 70-78.
- Douglas, J. S. 1976. Advanced guide to hydroponics. Drake Publishers. New York, NY, USA.
- El-Katatny, M. H., A. M. Hetta, G. M. Shaban, and H. M. El-Komi. 2003. Improvement of cell wall degrading enzymes production by alginate encapsulated *Trichoderma* spp. Food Technol. Biotechnol. 41: 219-225.
- Elliot, M., S. F. Shamoun, G. Sumampong, D. James, S. Masri and A. Varga. 2009. Evaluation of several comercial biocontrol products on European and North American populations of *Phytophthora ramorum*. Biocontrol Sci. Technol. 19: 1007-1021.
- Gunasekaran, S., T. Wang, and C. Chai. 2006. Swelling of pH-sensitive chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogels. J. Appl. Polymer Sci. 102: 4665-4671.
- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species-Oppportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2: 43-56.
- Ibarra, J. E., M. C. Del Rincón, E. Galindo, M. Patiño, L. Serrano, R. García, J. A. Carrillo, B. Pereyra-Alfárez, A. Alcázar-Pizaña, H. Luna-Olvera, L. Galán-Wong, L. Pardo, C. Muñoz-Garay, I. Gómez, M. Soberón y A. Bravo. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Rev. Latinoam. Microbiol. 48: 113-120.
- Khan, W. M., B. Prithviraj, and D. L. Smith. 2002. Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. Photosynthetica 40: 621-624.
- Koch, E. 2001. Effect of biocontrol agents on plant growth in the absence of pathogens. Tri-trophic interaction in the rhizosphere. IOBC/ wprs Bulletin 24: 81-89.
- Lamarque, G., G. Chaussard, and A. Domard. 2007. Thermodynamic aspects of the heterogeneous deacetylation of  $\beta$ -Chitin: Reaction mechanism. Biomacromolecules 8: 1942-1950.
- Mackenzie, A. J., S. T. Woods, and M. T. Windham. 1995. Enhanced root and shoot growth of chrysanthemum cuttings propagated with the fungus *Trichoderma harzianum*. HortScience 30: 496-498.
- Mahmoud, D. A. R. and W. A. Helmy. 2009. Potential application of immobilization technology in enzyme and biomass production. J. Appl. Sci. Res. 5: 2466-2476.
- Moliszevska, E. B. 2001. Side Effects of herbicides on some soil fungi and plant tissues. Tri-trophic interactions in the rhizosphere. IOBC/wprs Bull. 24: 111-116.
- Myskow, W. 1989. Związek między aktywnością biologiczną gleby, a jej żyznością i urodzajnością. Biologiczne metody podnoszenia żyzności i urodzajności gleb. Mat. Szkol. Pulawy: 51-53.
- Nge, K. L., N. Nwe, S. Chandkrachang, and W. F. Stevens. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. J. Plant Sci. 170: 1185-1190.
- Ousley, M. A., J. M. Lynch, and J. M. Whipps. 1993. Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. Microbial Ecol. 26: 277-285.
- Ozby, N., S. E. Newman, and W. M. Brown. 2004. The effect of the *Trichoderma harzianum* strains on the growth of tomato seedlings. Acta Hort. 635:131-135.
- Pastucha, A. 2005. The effect of chitosan on the formation of microorganism communities in the rhizosphere soil of soybean. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus 4: 69-77.
- Pérez, N. 2010. Alternativas al control químico de plagas. Revista Virtual REDESMA 4: 1-13.
- Rabea, E. I., M. E. T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. Biomacromolecules 4: 1457-1465.
- Rabeendran, N., D. J. Moot, E. E. Jones, and A. Stewart. 2000. Inconsistent growth promotion of cabbage and lettuce from *Trichoderma* isolates. N. Z. Plant Prot. 53: 143-146.
- SAS Institute Inc. 2002. JMP User's Guide, Versión 5.0.1 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Shoresh, M. and G. E. Harman. 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: A proteomic approach. Plant Physiol. 147: 2147-2163.

Singh, A., S. S. Narvi, P. K. Dutta, and N. D. Pandey. 2006. External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde. *Bull. Mater. Sci.* 29: 233-238.

Yedidia, I., N. Benhamou, and I. Chet. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1061-1070.