

Artículo original

## Capacidad de *Trichoderma* spp. como estimulante de la germinación en maíz (*Zea mays* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

### *Capacity of Trichoderma spp. as a stimulator of germination in maize (Zea mays L.) and frijol (Phaseolus vulgaris L.)*

Samil Hernández Mejías, René Novo Sordo, María Aurora Mesa Pérez, Anabel Ibarra Mederos, Daylén Hernández Rodríguez

Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana. Autopista Nacional km 23½. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo-e: samil@unah.edu.cu

Recibido: 12/septiembre/2017 Aprobado: 22/noviembre/2017

**Resumen:** El objetivo del trabajo presentado fue seleccionar cepas de *Trichoderma* (Persoon ex S. F Gray) con capacidad estimuladora de la germinación vegetal en maíz y frijol. El ensayo se realizó en el laboratorio de Fitopatología del departamento de Biología-Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana. Se probaron los filtrados de cuatro cepas, diluidos a dos concentraciones: 1:200 y 1:400. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo bifactorial. Los tratamientos fueron dos cepas de *Trichoderma viride* (T4 y T5) y dos de *Trichoderma harzianum* (A29 y A20). Se utilizó como testigo la imbibición de las semillas en agua destilada estéril bajo las mismas condiciones que el resto de los tratamientos. El porcentaje de germinación fue determinado, diariamente, hasta cinco días después de la inoculación. Las cepas de *Trichoderma harzianum* (A29 y A20) estimularon la germinación de las semillas de frijol y maíz.

**Palabras claves:** *Trichoderma*, estimulación de la germinación, frijol, maíz

**Abstract:** The work was carried out in the Phytopathology Laboratory of the Department of Biology-Plant Health of the Faculty of Agronomy of the Agrarian University of Havana. It aimed to select strains of *Trichoderma* (Persoon ex S. F Gray), with capacity to stimulate plant germination in corn and bean. Seed inoculation was performed by the technique of González et al. (1992). The filtered were diluted to two 1: 200 and 1: 400 concentrations. A completely randomized design with bifactorial arrangement was used. The treatments were the four strains of *Trichoderma viride* (T4 and T5) and *Trichoderma harzianum* (A29 and A20) and the two concentrations for a total of eight per plant species. The imbibition of the seeds in sterile distilled water under the same conditions as the rest of the treatments was used as control. The percentage of germination was determined daily up to five days after inoculation. The strains of *Trichoderma harzianum* (A29 and A20) stimulated the germination of bean and maize seeds.

**Key words:** *Trichoderma*, germination stimulation, bean, maize

## Introducción

Desde hace muchos años, es conocida la habilidad de los microorganismos para incrementar la tasa de germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial, de su sistema radicular.

Sin embargo, no se conocen con certeza estos mecanismos aun cuando puede asegurarse que muchos de ellos están vinculados a mecanismos indirectos de control biológico, pues permiten un mejor estado nutricional en la planta y una mejor respuesta a diferentes tipos de estrés (Keyser et al. 2016).

Se ha comprobado que los hongos del género *Trichoderma* producen sustancias estimuladoras del crecimiento y el desarrollo de las plantas, a través del establecimiento de relaciones simbióticas con estas. Dichas sustancias actúan como catalizadores o aceleradores de los tejidos meristemáticos primarios en las partes jóvenes de aquellas, por lo que inducen su reproducción celular, y así alcanzan un desarrollo más rápido que las que no hayan sido tratadas con dicho microorganismo (Hoyos-Carvajal y Bissett 2011).

Keyser et al. (2016) plantean que existen evidencias de que *Trichoderma* sp. puede inducir el crecimiento de las plantas al actuar como bioestimulante, aun en condiciones en las que el suelo esté libre de patógenos.

Los bioestimulantes son compuestos orgánicos que difieren de los nutrientes. En pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican los procesos fisiológicos de las plantas (Sanivada y Challada 2014).

La inoculación con *Trichoderma* provoca, también, una serie de efectos secundarios en la planta como la producción de vitaminas y de gran cantidad de enzimas. Ello hace que la raíz absorba mejor los nutrientes y esta crezca más rápido (Páez 2008).

Estudios realizados por Cubillos-Hinojosa et al. (2011) señalaron que *Trichoderma harzianum* estimula la germinación y el crecimiento de plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). También, demostraron su actividad antagonista frente al patógeno *Fusarium* spp.

Otros autores han comprobado que la inoculación con *T. harzianum* aporta beneficios a través de la descomposición de la materia orgánica. Al ocurrir este proceso, se liberan nutrientes que de otra forma no estarían disponibles y, además, se favorece la actividad solubilizadora de los fosfatos (Awasthi et al. 2011).

Considerando todo lo anteriormente expuesto, este trabajo se propuso como objetivo seleccionar cepas de *Trichoderma* (Persoon ex S. F Gray) con capacidad estimuladora de la germinación vegetal en maíz y frijol.

## **Materiales y métodos**

Para la determinación del efecto bioestimulante de *Trichoderma* sobre el proceso y los cultivos aludidos se procedió de la siguiente manera:

La inoculación de la semilla se realizó por la técnica de González et al. (1992). Los cultivos puros obtenidos se diluyeron a las concentraciones 1: 200 y 1: 400. Luego, las semillas se airearon, a la sombra, unos minutos, para secarlas.

Las semillas inoculadas y las testigos se sembraron en bandejas de metal que contenían 1 kg de suelo Ferralítico Rojo, tamizado en una malla de 2 mm. Se sembraron 25 semillas por tratamiento con tres repeticiones. Se le añadió agua hasta alcanzar una humedad equivalente al 60% de la capacidad total de retención, manteniéndose a una temperatura de  $26.5 \pm 1^\circ\text{C}$ , una humedad relativa entre 53-79% y un fotoperiodo de 11 horas de luz y 13 de oscuridad.

El experimento se realizó utilizando un diseño completamente aleatorizado. Los tratamientos fueron constituidos a partir de las cuatro cepas de *Trichoderma* T4, T5, A20 y A29 a las dos concentraciones. En el testigo, las semillas fueron embebidas en agua destilada estéril, bajo las mismas condiciones que el resto de los tratamientos.

Se determinó el porcentaje de germinación en el caso del frijol a las 48 y 72 h y para el maíz a las 96 y 144 h. Los resultados obtenidos fueron transformados según la expresión de  $\arcsen \sqrt{p}$ . Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza simple en cada momento en el que se aplicó la prueba de probabilidad de Tuckey al 5%, según el paquete estadístico SPSS versión 20.0.

## Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en frijol mostraron que existen diferencias significativas entre los aislamientos, la concentración utilizada y en la interacción entre ambos factores (Tabla 1). Las mejores combinaciones fueron: *T. harzianum* A29 a la concentración 1/400 y *T. harzianum* A20 a la concentración 1/400, según Tuckey para  $p < 0.05$ .

A las 48 horas se observa una germinación superior a 34% si se utiliza la cepa *T. harzianum* A20 y de 40% si se aplica la cepa *T. harzianum* A29. La diferencia respecto del testigo es de 26 y 32%, en ese orden. El 100% de la germinación de las semillas de frijol inoculadas con ambas cepas se logró a los cuatro días, mientras que en el testigo se alcanzó a los cinco.

Las combinaciones de los aislamientos *T. harzianum* A29 y A20 a la concentración 1/200 también estimularon la germinación, sin embargo, estos son menos efectivos que en concentración 1/400 en 10-12%. Ello puede deberse a un efecto inhibitorio producido por el exceso de auxinas liberadas por el microorganismo, tal como lo plantean Mukherjee et al. (2013) y Cardoso-Lopes et al. (2012). Al evaluar el efecto de cuatro aislamientos de *Trichoderma* en la estimulación de la germinación de semillas de maracuyá (*P. edulis* Sims) los investigadores referidos encontraron que tres de los cuatro tuvieron mayor efectividad cuando se encontraban a una concentración menor.

En el caso del maíz, también se hallaron diferencias significativas entre los aislamientos, la concentración utilizada y en la interacción entre ambos (Tabla 2). Las mejores combinaciones fueron: *T. harzianum* A29 a la concentración 1/400 y *T. harzianum* A20 a la concentración 1/400, según Tuckey para  $p < 0.05$ . A las 48 horas se observa una germinación de 50 % si se utiliza la cepa *T. harzianum* A20 y 28% si se aplica la cepa *T. harzianum* A29. La diferencia respecto del testigo, fue de 20 y 38%, en ese orden. A los seis días, se alcanzó 100% de la germinación de las semillas de maíz inoculadas con ambas cepas, mientras que en el testigo se alcanzó a los siete. Las combinaciones de los aislamientos *T. harzianum* A29 y A20 a la concentración 1/200 también estimularon la germinación de las semillas de maíz, sin embargo, estos son menos efectivos que en concentración 1/400 en 8-10%. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Van Munster et al. (2012). Mediante la utilización de biopreparados a base de *Trichoderma*, dichos investigadores provocaron la aceleración de la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) y café (*Coffea arabica*) respecto del testigo.

Tabla 1. Efecto de cepas de *Trichoderma* sobre la germinación de semillas de frijol (%)

Especie/cepa	48 h		72 h	
	X orig.	X transf.	X orig.	X transf.
<i>T. harzianum</i> A29 (C1)	30.00	0.3371 abc	60.00	0.4247 bc
<i>T. harzianum</i> A29 (C2)	40.00	0.3676 a	80.00	0.4753 a
<i>T. harzianum</i> A20 (C1)	22.00	0.3107 bc	52.00	0.4032 cd
<i>T. harzianum</i> A20 (C2)	34.00	0.3495 ab	72.00	0.4550 ab
<i>T. viride</i> T4 (C1)	26.00	0.3127 bc	46.00	0.3862 de
<i>T. viride</i> T4 (C2)	30.00	0.3354 abc	60.00	0.4245 bc
<i>T. viride</i> T5 (C1)	18.00	0.2966 cd	38.00	0.3616 e
<i>T. viride</i> T5 (C2)	30.00	0.3376 ab	58.00	0.4190 bcd
Control	8.00	0.2593 d	24.00	0.3181 f
ESx		0.014		0.0126
CV(%)		9.88		6.90

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente, según Tukey ( $p \leq 0.05$ )

Leyenda: C1 = 1mL de cultivo puro/200 mL agua; C2 = 1 mL /400 mL de cultivo puro agua

En todos los tratamientos se estimuló la germinación al inocular el hongo, ya fuese utilizando la concentración 1/200 o 1/400. Ello demuestra que todos manifestaron un efecto estimulador respecto del testigo. El aislamiento A29 inoculado a la concentración 1/400 es el que mayor efecto ejerce sobre la germinación de la semilla de maíz, evidenciando un incremento a las 96 horas, de 8% respecto de los tratamientos T5 y T4 a la concentración 1/400. Según Tuckey, esta diferencia es significativa estadísticamente para  $p < 0.05$ .

Tabla 2. Efecto de cepas de *Trichoderma* sobre la germinación de semillas de maíz (%)

Tratamientos	96 h		144 h	
	X orig.	X transf.	X orig.	X transf.
<i>T. harzianum</i> A29 (C1)	20.00	0.3040 d	80.00	0.4760 bc
<i>T. harzianum</i> A29 (C2)	50.00	0.3974 a	100.00	0.5236 a
<i>T. harzianum</i> A20 (C1)	24.00	0.3174 cd	76.00	0.4653 c
<i>T. harzianum</i> A20 (C2)	28.00	0.3314 cd	90.00	0.5002 ab
<i>T. viride</i> T4 (C1)	20.00	0.3047 d	70.00	0.4501 cd
<i>T. viride</i> T4 (C2)	40.00	0.3685 ab	90.00	0.5002 ab
<i>T. viride</i> T5 (C1)	32.00	0.3437 bc	90.00	0.5002 ab
<i>T. viride</i> T5 (C2)	42.00	0.3743 a	90.00	0.5002 ab
Control	10.00	0.2667 e	60.00	0.4240 d
ESx		0.010		0.009
C.V. (%)		6.89		4.50

Medias con letras iguales, dentro de cada columna, no difieren significativamente, según Tukey ( $p \leq 0.05$ )

Leyenda: C1 = 1 mL de cultivo puro/200 mL agua; C2 = 1 mL de cultivo puro/400 mL agua

Resultados similares obtuvieron Suárez et al. (2011) al realizar estudios en semillas de cacao (*Theobroma cacao* L.) con *Trichoderma stromaticum*. Estos demostraron que dicho antagonista estimuló la germinación y el crecimiento de las plantas, disminuyendo el tiempo en dos días menos respecto del testigo. Tal disminución tuvo un efecto positivo pues redujo el tiempo entre la siembra y la cosecha y, por consiguiente, la posibilidad de la ocurrencia de pérdidas debidas a la presencia de plagas.

Resultados similares fueron obtenidos por Harman et al. (2012) al utilizar *Trichoderma* T22 como estimulante para el desarrollo del cultivo de maíz. En este caso, se demostró que las plantas tratadas con el antagonista requieren 40% menos de fertilizantes nitrogenados que las que no fueron tratadas con este.

## Conclusiones

En la investigación realizada se demuestra que tanto en las concentraciones 1:200 como 1:400, las cepas de *T. harzianum* A29 y A20 estimularon la germinación de las semillas de frijol y de maíz respecto del testigo. En iguales concentraciones, las cepas de *T. viride* T4 y T5, tuvieron un efecto estimulante de la germinación inferior al logrado con *T. harzianum* A29 y A20 pero que, en el caso de las semillas aludidas, resultó superior al obtenido en el testigo,

## Referencias bibliográficas

Awasthi R, Tewari R, Nayyar H (2011) Synergy between plants and P-solubilizing microbes in soils: effects on growth and physiology of crops. *International Research Journal of Microbiology* 2 (12):484-503

- Cardoso Lopes FA, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandão RS, Monteiro VN, Junior ML, Guedes Coelho AS, Ulhoa CJ, Silva RN (2012) Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biol* 116:815–824
- Cubillos-Hinojosa JG, Valero N, Mejía L (2011) Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. asociado al complejo “secadera” en maracuyá, bajo condiciones de invernadero. *Medellín* 64(1):5821-5830
- González AA, Leguizamón J, Arbeláez G (1992) Control Biológico de *Rhizoctonia solani* en semilleros de café. *Cenicafé* 43(3):23-27
- Gupta VK, Tuohy MG, Sharma GD (2013) Biotechnology of *Trichoderma*: an overview. In: Gupta VK, Tuohy MG, Sharma GD, Gaur S (eds.), *Applications of Microbial Genes in Enzyme Technology*. Nova Science Publishers, USA, pp 375–393
- Harman GE, Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito M (2012) *Trichoderma*—from basic biology to biotechnology. *Microbiology* 158:1–2
- Hoyos-Carvajal L, Bissett J (2011) Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control* 51:409–416
- Keyser ChA, Kristensen KT, Meyling NV (2016) Dual effects of *Metarhizium* spp. and *Clonostachys rosea* against an insect and a seed-borne pathogen in wheat. *Pest Management Science* 72:517-526
- Mukherjee PK, Horwitz BA, Herrera-Estrella A, Schmoll M, Kenerley CM (2013) *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology*:105-129
- Páez O (2008) Uso agrícola de *Trichoderma*. <http://www.soil-fertility.com/trichoderma/espagnol/index.html>. Consultado 10 enero 2016
- Sanivada SK, Challada M (2014) Mycolytic effect of extracellular enzymes of entomopathogenic fungi to *Colletotrichum falcatum*, red rot pathogen of sugarcane. *Fungal pathogens of sugarcane. Journal of Biopesticides* 7(1):33-37
- SPSS INC (2002) SPSS (Programa Estadístico). SPSS INC-11.5
- Suárez M, Fernández B, Osvaldo V, Gámez C, Páez R (2011) Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(2):35-43
- Van Munster JM, Van der Kaaij RM, Dijkhuizen L, Van der Maarel MJ (2012) Biochemical characterization of *Aspergillus niger* Cfcl, a glycoside hydrolase family 18 chitinase that releases monomers during substrate hydrolysis. *Microbiology* 158:2168–2179Z