

INMOVILIZACIÓN DE *Trichoderma harzianum* EN
HIDROGELES DE QUITOSÁN APLICADOS AL SUSTRATO EN
EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) EN
INVERNADERO

NAZARIO FRANCISCO FRANCISCO

TESIS

Presentada como Requisito parcial para
Obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Horticultura

Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro



PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Octubre de 2010

INMOVILIZACIÓN DE *Trichoderma harzianum* EN
HIDROGELES DE QUITOSÁN APLICADOS AL SUSTRATO
EN EL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*) EN
INVERNADERO

NAZARIO FRANCISCO FRANCISCO

TESIS

Presentada como Requisito parcial para
Obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Horticultura



Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Octubre de 2010

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Dirección de Postgrado

Inmovilización de *Trichoderma harzianum* en Hidrogeles de Qitosán Aplicados al Sustrato en el Cultivo de Tomate (*Solanum lycopersicum*) en Invernadero.

**Tesis
por**

Nazario Francisco Francisco

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial, para optar al grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD
EN HORTICULTURA**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal: _____
Dr. Adalberto Benavides Mendoza

Asesor: _____
Dra. Hortensia Ortega Ortiz

Asesor: _____
Dr. Homero Ramirez Rodriguez

Asesor: _____
Dr. Valentín Robledo Torres

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Director de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Octubre 2010

COMPENDIO

Inmovilización de *Trichoderma harzianum* en Hidrogeles de Quitosán Aplicados al Sustrato en el Cultivo de Tomate (*Solanum lycopersicum*) en Invernadero.

POR

NAZARIO FRANCISCO FRANCISCO

MAESTRIA EN CIENCIAS

HORTICULTURA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COHUILA, OCTUBRE DE 2010.

Dr. Adalberto Benavides Mendoza. – Asesor –

Palabras clave: Crecimiento vegetal, contenido mineral, xilema, estoma, CO₂.

En este trabajo se hace un estudio de la inmovilización del hongo *Trichoderma harzianum* (*Th*) en hidrogeles de quitosán y los efectos que esta unión presenta al aplicarlos al sustrato para la germinación y el crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*). Los hidrogeles mostraron ser un buen soporte para este microorganismo benéfico, ya que al realizar las pruebas de crecimiento fue posible detectarlos. Al hacer las pruebas de viabilidad del hongo en los tratamientos correspondientes, se observa una mayor cantidad de *T. harzianum* presente en los tratamientos donde se encuentra inmovilizado a

los 51 días después de la siembra que en los tratamientos donde se aplicó el *Th* en forma de suspensión libre. En cuanto al efecto sobre las plantas de tomate, se observó que los tratamientos con los hongos inmovilizados producían plantas con menor altura y biomasa vegetal, sin embargo el contenido mineral vegetal como P, Ca, y Cu fue mayor en estos tratamientos. Por otro lado, no se observó efecto sobre la anatomía vascular y estomática, y la asimilación del CO₂.

ABSTRACT

Immobilization of *Trichoderma harzianum* in Chitosan Hydrogels Applied to the Substrate in Tomato (*Solanum lycopersicum*) in Greenhouse.

BY

NAZARIO FRANCISCO FRANCISCO

MASTER OF SCIENCE

HORTICULTURE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, OCTOBER 2010.

Ph.D. Adalberto Benavides Mendoza. - Manager-

Keywords: Plant growth and mineral content, xylem, stoma, CO₂.

In this work was studied the immobilization of the fungus *Trichoderma harzianum* (Th) in chitosan hydrogels and the effects that this union has to be applied to the substrate for the germination and growth of tomato plants (*Solanum lycopersicum*). The hydrogels were shown to be suitable for handling this beneficial microorganism to express support and abundant growth. Was conducted a feasibility study of the fungus in the corresponding treatments, the results show an increased number of *T. harzianum* present in treatments where plant at 51 days after sowing in treatments where applied as a suspension Th

free. Regarding the effects on tomato plants, we observed that treatment with immobilized yeast producing plants with lower height and plant biomass, however the mineral content in biomass as P, Ca, and Cu in these same treatments. On the other hand, no effect was observed on the vascular anatomy and stomata, and assimilation of CO₂.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por sus pagos puntuales y por haber facilitado mi formación profesional.

Un merecido reconocimiento a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (**UAAAN**), mi casa de estudios, sin duda el haber pasado por sus aulas ha sido una experiencia que no cambiaría por nada.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada (**CIQA**), por haberme brindado el realizar satisfactoriamente mis actividades de tesis en sus instalaciones.

Mis más sinceros agradecimientos para mis asesores, **Dr. Adalberto Benavides Mendoza** del que he aprendido a tomar nuevas herramientas para mi formación profesional, **Dra. Hortensia Ortega Ortiz** por el ímpetu en sus enseñanzas durante la elaboración de esta tesis. Al **Dr. Valentín Robledo Torres** y **Dr. Homero Ramírez Rodríguez** por haber colaborado en mi formación profesional.

A los técnicos académicos que me ayudaron, **Carlos Alberto Arévalo Sanmiguel** del laboratorio de nutrición animal y **Norma Leticia Portos Gaona** de Citogenética, y a la **Dra. Norma Angélica Ruiz Torres** por el apoyo brindado en la calibración del equipo para medición de CO₂.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme vida para llegar hasta aquí, su licencia me ha permitido incursionar en un buen camino para mi formación.

A mi familia, sin lugar a dudas mi motor para seguir adelante. Mi esposa, la **Ing. Teresita Juárez Delgado**, por compartir conmigo tu sinceridad, amor, paciencia y apoyo incondicional, nuestro hijo **Osvaldito** quien es la alegría de nuestro hogar.

A mi madre que en paz descansa y mi padre por ser los pilares en mi formación humana. Mis hermanos **Celerina** y **Moisés** que desde niños son también mis compañeros, amigos y confidentes. A mi hermanita **Vivianita** y mis sobrinos **Fabián** y **Esmeralda** que ya forman también parte de mi vida.

A mis compañeros de generación en la maestría, Guillermo Salomón Molina Abadía y José Noé Martínez Ramírez por su amistad.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Objetivo General	4
Objetivos Específicos	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Quitina y Quitosán	6
Características Físico-Químicas del Quitosán	7
Peso Molecular y Grado de Desacetilación.	7
Reactividad Química	9
Actividad Biológica	10
Actividad Antimicrobiana	10
Inducción de los Mecanismos de Defensa de la Planta	11
Aplicaciones en la Agricultura	11
Hidrogeles de Quitosán	12
Inmovilización Enzimática y Celular	14
<i>Trichoderma harzianum</i>	18
ARTICULO	21
MATERIALES Y MÉTODOS	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	41
LITERATURA CITADA	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Observaciones del crecimiento del hongo <i>T. harzianum</i> en medio sólido de las muestras de suelo donde se sembraron semillas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).	33
Cuadro 2	Variables de crecimiento en plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) en los diferentes tratamientos con <i>T. harzianum</i> y/o hidrogeles de quitosán.	36
Cuadro 3	Producción de biomasa vegetal en plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) en los diferentes tratamientos con <i>T. harzianum</i> y/o hidrogeles de quitosán.	37
Cuadro 4	Estudio anatómico del tejido vascular en tallo, raíz y hoja a los 42 días, y de estomas a los 35 días en plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) en los diferentes tratamientos con <i>T. harzianum</i> y/o hidrogeles de quitosán.	37
Cuadro 5	Contenido de minerales en base a la materia seca en plantas de tomate (<i>Solanum Lycopersicum</i>) en los diferentes tratamientos con <i>T. harzianum</i> y/o hidrogeles de quitosán.	38
Cuadro 6	Variable fotosintética en plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) en los diferentes tratamientos con <i>T. harzianum</i> y/o hidrogeles de quitosán.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura molecular de la quitina y quitosán.	6
Figura 2	Representación esquemática del hinchamiento de una red polimérica.	13
Figura 3	Entrecruzamiento de quitosán con dialdehídos.	14
Figura 4	Longitud de tallos en plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) en los diferentes tratamientos con <i>T. harzianum</i> y/o hidrogeles de quitosán (Tukey 0.05).	35

INTRODUCCIÓN

La producción intensiva de hortalizas es una actividad que demanda la protección y estimulación de los cultivos desde las etapas más tempranas con el objetivo de obtener un mayor rendimiento y calidad en la producción. Esto sin embargo, ha provocado el uso desmedido de agroquímicos que con el tiempo han causado daños al ambiente y a la salud humana. Una de las alternativas para solucionar este problema es el uso de “bioproductos”, los cuales se les encuentra disponibles en el mercado generalmente en forma de inoculantes, como lo es el caso del uso de microorganismos benéficos, no obstante la efectividad de estos microorganismos en el sitio de aplicación es incierta, ya que es afectada por varios factores que merman su presencia y efectividad, y propician la adquisición periódica de estos productos. Al respecto, se conocen ciertas técnicas empleadas comúnmente en biotecnología para el control de los microorganismos y sus subproductos como lo es la inmovilización celular, que pueden facilitar la presencia de los microorganismos benéficos en la agricultura al usar estas técnicas. Sin embargo, se hacen comúnmente en materiales poliméricos sintéticos y de alto costo; razón que limita su aplicación extensiva en la agricultura. El quitosán (Cs) por su parte es un polímero natural biocompatible y biodegradable con el ambiente obtenido de la modificación química de la quitina; considerado el segundo biopolímero más abundante. Este

polímero ha mostrado poseer características útiles a la agricultura, como su actividad antimicrobiana y la inducción de las respuestas de defensa de las plantas; la formación de hidrogeles aplicables como reservorio de agua y nutrientes; y la formación de películas para el recubrimiento de frutas; además también ha sido usado para el encapsulamiento de principios activos, y en la inmovilización de enzimas.

La inmovilización celular/enzimática ha sido ensayada en diversos tipos de soportes como el alginato y las carrageninas, principalmente por el método de atrapamiento y por unión covalente; sin embargo para llevar a cabo la inmovilización en estos soportes se requiere de altas temperaturas, considerables para las células vivas, y son de alto costo. El quitosán por su carga positiva adquiere la propiedad de un buen soporte, ya que puede establecer satisfactoriamente uniones electrostáticas con la mayoría de los microorganismos, cargados negativamente; debido a la presencia de grupos aminos a lo largo de la cadena del polímero que se unen a los grupos funcionales correspondientes a los aminoácidos de los microorganismos. Por lo anterior, es posible que mediante un método sencillo de inmovilización por adsorción en hidrogeles preparados previamente se pueden obtener grandes cantidades de células inmovilizadas.

Por otro lado, es bien sabido la existencia de microorganismos benéficos que protegen y estimulan a las plantas de forma natural, los cuales pudieran mediante la técnica de inmovilización con alguna sustancia como el quitosán mejorar su efectividad y mejorar su tiempo de uso en campo. Entre los

microorganismos benéficos más conocidos el *Trichoderma harzianum* (*Th*) es de los que más efectividad biológica presentan, refiriéndonos con esto a su actividad antagónica contra varios microorganismos fitopatógenos y en la estimulación del crecimiento vegetal. Sin embargo, existe poca información sobre el uso de estas en la agricultura, donde se estudien además los efectos sinérgicos que puedan provocar en las plantas. Estudios previos demuestran que la inducción de las respuestas de defensa provocados por inductores, producen cambios metabólicos y anatómicos marcados en las plantas hospedadas, como la alteración de las células en el sitio de inoculación por *Th* u oclusión de estomas de las plantas por *Cs*. Esto pudiera sugerir en casos extremos, modificaciones indeseables al resultar estas respuestas de inducción, en costos metabólicos por las plantas. Las plantas por ser un organismo vivo, se encuentran estrechamente ligados a los efectos provocados por la interacción con microorganismos o sustancias con actividad biológica, respondiendo con cambios en la expresión anatómica, morfológica o fisiológica, los cuales a su vez pueden tomarse como indicativos primarios de la respuesta al estrés biótico y abiótico. En un intento por responder esta interrogante el objetivo del presente trabajo es documentar la inmovilización del hongo *Trichoderma harzianum* en hidrogeles de quitosán como alternativa de manejo de los microorganismos benéficos y sus efectos en el crecimiento, la producción de biomasa, la absorción de minerales, la anatomía vascular y estomática, y en la actividad fotosintética de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) al aplicarlas al sustrato bajo invernadero.

Objetivo General

Documentar el efecto de la inmovilización de *Trichoderma harzianum* en hidrogeles de quitosán al aplicarlos en la siembra de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero.

Objetivos Específicos

Obtener hidrogeles de quitosán útiles para aplicarlos en cultivos hortícolas en invernadero.

Determinar el carácter hidrofílico de los hidrogeles de quitosán obtenidos.

Inmovilizar una cepa de *Trichoderma harzianum* nativa de esta región en los hidrogeles de quitosán.

Determinar la viabilidad del hongo *Trichoderma harzianum* inmovilizado en los hidrogeles de quitosán.

REVISIÓN DE LITERATURA

En años recientes la incorporación de nuevas tecnologías a la actividad agrícola y pecuaria ha revolucionado la producción tradicional. Técnicas biotecnológicas, informática, ciencia de los materiales, son sólo algunas de las herramientas que han permitido tener alternativas de manejo de la agricultura tradicional, el cual ha sido partícipe de los problemas ambientales. Existe por otro lado un avanzado entendimiento de las interacciones que las plantas presentan con el medio biótico, en las que se reconoce la existencia de microorganismos que actúan en perjuicio pero a la vez en beneficio en el desarrollo y crecimiento vegetal, rescatando esto último se han podido hacer varias indagaciones sobre cómo mejorar estas interacciones para beneficio de la producción de alimentos.

No obstante, es necesario hacer una adopción factible, puesto que son varias las implicaciones que ello representa. Una primera desventaja que se visualiza son los costos elevados de los materiales a incorporar. Por lo que son necesarias varias investigaciones sobre las técnicas adecuadas que permitan la utilización de éstas sin el derroche de otros recursos. Sin duda, uno de los materiales que prometen nuevas alternativas en la agricultura es el biopolímero quitosán, el cual por sus propiedades benéficas y por su procedencia de fuentes

renovables es necesario encontrar formas de uso que brinden mayor provecho a la actividad agrícola.

Quitina y Quitosán

El quitosán es un polímero policatiónico con una estructura y propiedades específicas. Se estima que la cadena polimérica del quitosán contiene más de 5000 unidades de glucasamina; aspecto que sin duda la hace poseer un peso molecular alto. Se obtiene después de un tratamiento alcalino severo a la estructura original de la quitina (*N*-acetilglucasamina) (Percot *et al.*, 2003).

El quitosán presenta la característica de ser insoluble en agua, pero es soluble en la mayoría de los ácidos orgánicos, esta característica aunada a su alta viscosidad y tendencia a coagular con proteínas a pH alto hacen su uso limitado. La quitina y el quitosán son dos polisacáridos químicamente similares a las celulosas al poseer a la glucosa como unidad repetitiva, diferenciándose únicamente por la presencia de grupos amino o acetamida en el carbono 2 (Figura 1), los cuales le dan reactividad química a estos polímeros, no siendo así para el grupo hidroxilo en la celulosa.

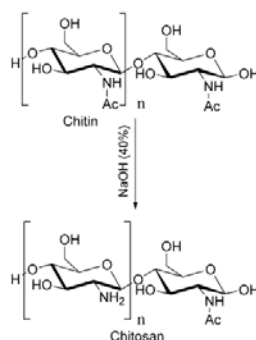


Figura 1. Estructura molecular de la Quitina y Quitosán. Fuente: (Rabea *et al.*, 2003).

Estos polímeros han sido sujetos de intensas investigaciones en las últimas dos décadas, principalmente al visualizarse su uso potencial en la industria comparado con la celulosa. Recientes investigaciones encuentran nuevas aplicaciones en el área de la biomedicina y en la generación de nuevos materiales. Esta versatilidad se encuentra estrechamente relacionada con las características físico-químicas (como el peso molecular y el grado de desacetilación) de este polímero, aspecto que se define principalmente al ser obtenido (Sánchez *et al.*, 2007).

Características Físico-Químicas del Quitosán

Está comprobado que las características físico-químicas del quitosán (peso molecular y grado de desacetilación) así como la concentración usada se encuentran íntimamente relacionadas con sus propiedades biológicas (Rabea *et al.*, 2003). Varias pruebas de laboratorio usan quitosán a diferentes pesos moleculares y grados de desacetilación obteniendo con ellos diversos resultados, como por ejemplo para la confrontación con microorganismos fitopatógenos. Estos la mayoría de las veces son realizados en laboratorio, lo que conlleva el realizar ensayos en condiciones controladas y a la vez asépticas. Sin embargo un uso en espacios abiertos como en los campos de la agricultura, involucra un sinnúmero de variables que interactúan con los efectos directos del quitosán.

Peso Molecular y Grado de Desacetilación.

El peso molecular de la quitina es usualmente mayor a 1'000,000, mientras que el producto comercial de quitosán se encuentra entre 100,000 y

1'200,000. Este puede ser determinado por métodos tales como la cromatografía, dispersión de luz y viscosimetría. Entre éstos, la viscosimetría es el método más simple y rápido para su determinación (Goosen-Mattheus., 1997).

El peso molecular es una característica muy importante a considerar al momento de aplicar el quitosán. Por ejemplo, se ha documentado que un peso molecular alto incide en la resistencia viral de plantas de papa (*Solanum tuberosum*) al virus PVX (Chirkov *et al.*, 2001). Más recientemente se mostró que el efecto antioxidante del quitosán puede deberse a su peso molecular bajo, al comportarse como atrapador de radicales libres en semillas de girasol (Cho *et al.*, 2008).

El grado de desacetilación del quitosán por otro lado es una característica importante al momento de manipularla. Un alto grado de desacetilación permite la presencia de un mayor número de grupos amino en la cadena polimérica del quitosán, los cuales al protonarse facilitan su solubilización en medio ácido. La eliminación de los grupos acetilo se consigue al someter a la quitina a un tratamiento severo con álcalis concentrados y altas temperaturas, sin embargo se reconoce que no es posible la eliminación total de los grupos acetilos aún con estas técnicas; el grado de desacetilación del quitosán que actualmente se maneja oscila entre los 70% a 95%.

Han sido estudiados varios métodos para determinar el grado de acetilación de la quitina y el quitosán, todos ellos con ventajas y desventajas. Una de ellas es la que emplea la absorción de energía en la banda del

infrarrojo, usando varias relaciones de absorbancia (A) tales como A_{1560}/A_{2875} , A_{1655}/A_{2875} , A_{1655}/A_{3450} , A_{1320}/A_{3450} , A_{1655}/A_{1070} , A_{1655}/A_{1030} , A_{1560}/A_{1160} , A_{1560}/A_{897} , y A_{1320}/A_{1420} ésta última es la que determina la absorción característica de las amidas a una longitud de onda a 1320 cm^{-1} y del grupo metilo a 1420 cm^{-1} .

Reactividad Química

El quitosán es un polímero lineal constituido por unidades D(+)-glucosamina unidas por enlaces β -(1,4). Químicamente es denominado poli(2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa). Presenta grupos funcionales hidroxilo, amino y N-acetilamino, los cuales le dan la propiedad de formar puentes de hidrógeno intermoleculares que le otorgan una gran estabilidad al polímero, al mismo tiempo estos dos últimos grupos le proporcionan el carácter hidrófilo e hidrófobo dependiendo del grado de desacetilación.

Los grupos amino libres presentes en la cadena polimérica, se protonan en medio ácido, proporcionándole de esta manera al polímero la característica de ser soluble en este medio. Al mismo tiempo la protonación de los grupos amino libres dan origen a un grupo amino con carga $-\text{NH}_3^+$, por lo que el polímero adquiere la característica de policación, comportándose de esta manera como floculante, adsorbente y bioadhesivo (Cartaya *et al.*, 2009).

También ha sido estudiada la propiedad del quitosán de formar complejos polielectrolítos con polianiones al ser usado como inductor de tolerancia en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Ortega-Ortiz *et al.*, 2003). Estos complejos se comportan como hidrogeles y a la vez como

membranas, por ello se les ha encontrado utilidad en sistemas de liberación de sustancias.

Actividad Biológica

El quitosán dada sus características químicas presenta propiedades útiles para la agricultura, tal como su actividad antimicrobiana y la inducción de los mecanismos de defensa de las plantas, los cuáles se diferencian de otros polisacáridos como el alginato.

Actividad Antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana del quitosán ha sido observada contra un amplio rango de microorganismos, los cuales incluyen desde hongos fitopatógenos, bacterias, nemátodos y algas. Esto sin embargo, depende de las características del quitosán usado, de la fuente de extracción, de las condiciones ambientales, y del hospedante. En el caso del control de los hongos se reconoce que son efectivos tanto para los que atacan la parte foliar de las plantas como las radicales, mostrando en ensayos *in vitro* una inhibición de crecimiento distinta en los hongos dependiendo de algunos factores como las condiciones del medio de cultivo (Rabea *et al.*, 2003).

Así también, el control en las bacterias es similar, sin embargo es de recalcar que la ventaja que el quitosán presenta sobre los desinfectantes convencionales es que no es tóxico y es biodegradable. El efecto que el quitosán ejerce sobre las bacterias es considerada desde su acción bacteriostática hasta bactericida (Rabea *et al.*, 2003).

También se ha encontrado acción antiviral del quitosán en plantas de papa (*Solanum tuberosum*), aunque en este caso el control le es atribuido a la inducción de resistencia de la planta ante el virus (Chirkov *et al.*, 2001).

La literatura reporta que la efectividad antimicrobiana del quitosán se encuentra estrechamente relacionada con la concentración usada, así como algunas características como la carga positiva en el carbono 2 del monómero glucosamina; el cual parcialmente explica la manera de cómo afecta las membranas cargadas negativamente de las células microbianas. Otro mecanismo propuesto es el que relaciona la acción quelante del quitosán, que al unirse a los metales traza inhibe la producción de toxinas y por lo tanto el crecimiento microbiano (Rabea *et al.*, 2003).

Inducción de los Mecanismos de Defensa de la Planta.

Los inductores son sustancias que pueden provocar respuestas de defensa cuando son aplicados a tejidos vegetales. Se reconocen como tales a los oligosacáridos como son los oligoglucanos, oligoquitina, oligoquitosán, y el ácido oligogalacturónico.

Las respuestas de defensa ocasionadas por el quitosán van desde la muerte celular localizada, producción de especies reactivas de oxígeno, los cambios estructurales en la pared celular, la acumulación de proteínas de defensa, y la biosíntesis de fitoalexinas (Rabea *et al.*, 2003).

Aplicaciones en la Agricultura

Son varias las aplicaciones que se le dan al quitosán en la agricultura. Estas van desde la aplicación directa sobre las semillas para estimular la

germinación (Cho *et al.*, 2008); aplicaciones foliares para la protección contra el estrés hídrico (Bittelli *et al.*, 2001); en forma de plaguicida (Falcón-Rodríguez *et al.*, 2007); y como recubrimiento de frutas para la prevención del deterioro (Bautista-Baños *et al.*, 2005); entre otros. Pero al mismo tiempo, el quitosán presenta propiedades interesantes que han sido estudiadas en el campo de la biotecnología, los cuales pudieran aplicarse a la agricultura con el objetivo de obtener un mayor provecho, como lo es la formación de membranas o hidrogeles usados como matriz para la liberación controlada de principios activos (Vodná *et al.*, 2007) o de inmovilización celular y enzimática (Pereira *et al.*, 2003).

Hidrogeles de Quitosán

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales de alto peso molecular y carácter hidrofílico, capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos. Estas redes se forman al agregar un entrecruzante a una matriz polimérica, el resultado de esto es un material de dos partes (la red y el líquido), en el que el líquido impide que el sólido se colapse, mientras la red impide que el líquido fluya libremente (Figura 2). El material entrecruzado adquiere el nombre de hidrogel si el líquido que fluye a través de ella es agua (Rogel-Hernández *et al.*, 2003). Los hidrogeles que se obtienen pueden ser caracterizados en base a los objetivos que se persigan, los más usuales son el porcentaje de hinchamiento, o sea el aumento solo en volumen, y el contenido de agua en el equilibrio. Una característica de los hidrogeles de gran importancia es que su comportamiento en agua destilada es distinta que si el

agua presenta sales, muy común en aguas de riego, reduciéndose su capacidad de absorción conforme presente mayor cantidad de sales.

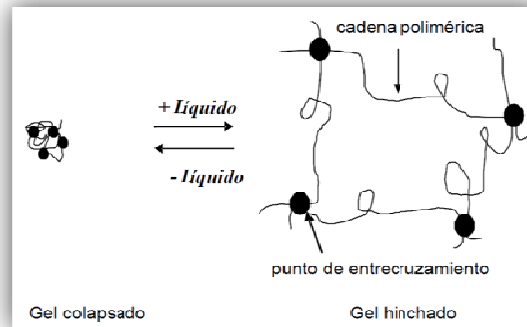


Figura 2. Representación esquemática del hinchamiento de una red polimérica. (Fuente: Rogel-Hernández *et al.*, 2003).

Los hidrogeles se aplican ampliamente en la agricultura como almacenes de agua para las raíces de las plantas. Sin embargo sus beneficios van más allá que el simple acercamiento del recurso hídrico, por ejemplo se ha visto que también mejoran la disponibilidad de elementos minerales, disminuyen la compactación del suelo, y propician la vida de los microorganismos en el hábitat radicular.

Los hidrogeles pueden ser elaborados a partir de polímeros sintéticos (poliésteres, poliamidas, polianhídridos) o naturales (poliaminas, polisacáridos), los polímeros de base polisacárida representan la mayor fuente de materiales, los cuales incluyen agarosa, alginato, carrageninas, y dextranos. Sin embargo estos presentan la desventaja de que son de alto costo. El quitosán presenta la ventaja de que además del bajo costo, presenta amplia versatilidad en sus formas físicas como polímero.

La característica de hinchamiento del quitosán para la formación de hidrogeles ha sido tema de varios estudios (Spinks *et al.*, 2006; Gunasekaran *et*

al., 2006), debido a la amplia aplicabilidad que deriva de ella (Tang and Qian, 2007; Zhao and Mitomo *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2007), cabe destacar que el grado de hinchamiento alcanzado por este polímero y su aplicabilidad dadas las características del hidrogel obtenido, como la facilidad ante la manipulación manual; resistencia mecánica; y persistencia por un período de tiempo, son distintas dependiendo del método (Felinto *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008) o el entrecruzante utilizado para elaborarlo (Goncalves *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007; Santoni *et al.*, 2008) para elaborarla. Particularmente la formación de los hidrogeles de quitosán con entrecruzantes dialdehídos, como el glutaraldehído, se caracteriza por la reacción de los grupos aminos que se transforman en grupos iminas (Sánchez *et al.*, 2007) (Figura 3).

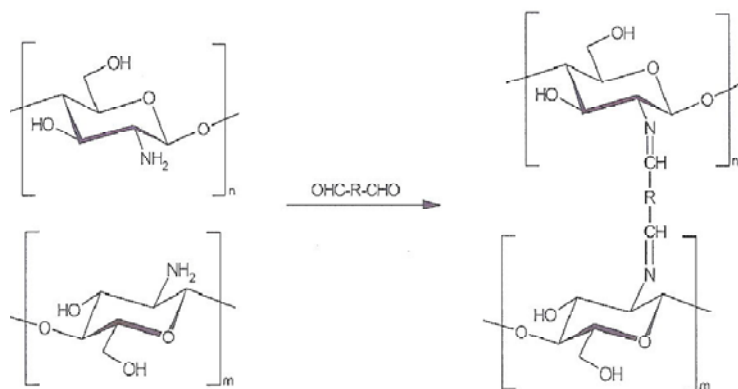


Figura 3. Entrecruzamiento de Quitosán con dialdehídos (Fuente: Sánchez *et al.*, 2007).

Inmovilización Enzimática y Celular

La inmovilización enzimática o celular es una técnica muy empleada en el campo de la biotecnología, esta ha sido practicada con varios propósitos, una de ellas es el confinamiento de biocatalizadores o subproductos en una matriz

para un mejor aprovechamiento. Comúnmente esta técnica es llevada a cabo en materiales para soporte y métodos de inmovilización muy variados, lo que sugiere que no existe algún método o soporte ideal para un manejo estándar. Los soportes para la inmovilización celular pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica, estos a su vez pueden ser naturales o sintéticos, dentro de los orgánicos los polisacáridos son los más utilizados por su característica hidrofílica, como lo son las carrageninas y el alginato, sin embargo los primeros suelen ser muy caros, el alginato por su parte presenta baja estabilidad ante algunos compuestos como los fosfatos y los citratos, usados comúnmente en los medios de cultivo.

Los métodos de inmovilización celular/enzimática más empleados son adsorción, enlace covalente, atrapamiento, encapsulamiento, y reticulado (Bickerstaff, 1997), los cuales han sido realizados factiblemente en materiales poliméricos bajo la forma de hidrogel, el cual debe cumplir con los requisitos de biocompatibilidad, estabilidad química y mecánica, permeabilidad al oxígeno, difusión de nutrientes y subproductos elaborados por las células inmovilizadas (Jen *et al.*, 1995).

Métodos de Inmovilización Enzimática y Celular

a) Por Adsorción

Este método involucra fuerzas electrostáticas entre la superficie de un soporte y el material biológico, principalmente las fuerzas de Van-Der Waals. Estas fuerzas son muy débiles, pero lo suficientemente grandes en número

para permitir uniones razonables. Es necesario considerar que la carga del soporte es de gran importancia dado que la mayoría de las células de los microorganismos como las bacterias, se encuentran cargadas negativamente y un soporte con carga positiva facilita esta interacción. La ventaja de este método es el poco daño a las enzimas o las células. El procedimiento consiste en la mezcla de un soporte con propiedades de adsorción y el material biológico por un período de incubación (Bickerstaff, 1997).

b) Por Enlace Covalente

Este método de inmovilización involucra la unión covalente entre la enzima o la célula y un material de soporte. La unión es formada entre los grupos funcionales del soporte y los aminoácidos que se encuentran en la superficie de la enzima, por ejemplo los grupos amino de la lisina o la arginina. Los soportes más usados son de naturaleza polisacárida, como la celulosa, principalmente por su carácter hidrofílico el cual propicia una alta actividad enzimática, no obstante la mayoría de estos soportes naturales presentan el inconveniente de que son susceptibles al ataque microbiano. Estos soportes son manejados normalmente en forma de gotas. Una alternativa a la desintegración por microorganismos es el uso de materiales sintéticos como la sílica porosa, sin embargo éstos son más caros y menos hidrofílicos. El procedimiento empleado en este método involucra el uso de reactivos para activar grupos funcionales del soporte, no obstante este método puede provocar cambios en los centros activos de las enzimas.

c) Por Atrapamiento

Este método se diferencia de la inmovilización por adsorción y de la enlace covalente en que la enzima o célula se localiza en un soporte que actúa como barrera a la transferencia de masas, realizado comúnmente en la estructura enrejada de un hidrogel. Se lleva a cabo al mezclar la enzima con un monómero en solución y entonces polimerizándolo por cambio en la temperatura o por la adición de un reactivo. Este método suele ser más adecuado para la inmovilización de enzimas altamente estables o para células no vivas, sin embargo, especies de *Trichoderma* han sido favorablemente inmovilizados en hidrogeles de alginato mediante este método (El-Katatny *et al.*, 2003).

d) Por Encapsulación

Este método de inmovilización es similar al de atrapamiento en que es realizado en solución donde las células o enzimas presentan movimiento libre, pero son restringidos en hidrogeles, la diferencia es que ésta se lleva a cabo en sustratos en forma de microcápsulas donde los subproductos son los únicos que pueden cruzar las membranas semipermeables. Un problema frecuente es la ruptura de las membranas cuando hay una excesiva acumulación de los productos.

e) Por Reticulado o Entrecruzamiento

En este método se emplean entrecruzantes como el glutaraldehído para formar uniones intermoleculares entre las enzimas o células. Sin embargo la

toxicidad de estos reactivos es un factor limitante para la aplicación de este método en células vivas y muchas enzimas (Bickerstaff, 1997).

Un detalle que surge en cuanto al uso de estos métodos para la inmovilización celular de microorganismos útiles en la agricultura, es la necesidad de que el material de soporte con el producto inmovilizado sea fácilmente manipulable, pueda escalarse, y ser producido a bajo costo. Tanto el método como el soporte van de la mano y al mismo tiempo determinan el costo y los reactivos a usarse, este último considerable para las células vivas.

Trichoderma harzianum

El género *Trichoderma spp.* agrupa a un conjunto de hongos que viven libremente en la mayoría de los suelos alrededor del mundo. Estos hongos se les encuentra interactuando con las raíces de las plantas y en ambientes foliares. El color característico de este hongo es verde oscuro. Su estructura de esporulación son conidios, y su estructura de resistencia son clamidosporas. Este es un hongo que soporta un rango de temperaturas que van de los 4 hasta los 38°C (Howell, 2003).

Los hongos de *Trichoderma* se caracterizan también por alimentarse de otros hongos, de los exudados de las raíces, y materia orgánica. Sin embargo para su manipulación requieren de fuentes de nitrógeno, los cuales favorablemente pueden suministrarse con L-alanina, L-aspártico, ácido L-glutámico, y ácido casamínico. También requieren de fuentes de carbono, las

cuales pueden suministrarse con dextrosa, fructosa, manosa, galactosa, xylosa, ribosa, y celobiosa.

Es conocido que estos hongos producen un amplio rango de sustancias antibióticas y por parasitar a otros hongos. También se sabe que ellos compiten con otros microorganismos; por ejemplo, compiten por los exudados de las semillas que estimulan la germinación de propágulos de los hongos fitopatógenos en el suelo y, más generalmente compiten con los microorganismos del suelo por nutrientes y/o espacio. Esto lo logran inhibiendo o degradando las enzimas pectinasas y otras enzimas que son esenciales para los hongos patógenos, por ejemplo para penetrar las superficies foliares.

Recientes investigaciones demuestran que los hongos de *Trichoderma* inducen una resistencia sistémica y localizada en las plantas. Más aún, también se ha observado que algunas especies de este género tienen influencia substancial sobre el crecimiento y desarrollo vegetal.

En el género *Trichoderma* resalta la presencia de la especie *T. harzianum*. Este hongo ha sido sujeto de intensas investigaciones en el mecanismo de control que ejercen sobre otros hongos fitopatógenos; como los pertenecientes al damping off o secadera de las plántulas de la mayoría de los cultivos hortícolas. De los cuales se reconocen el micoparasitismo, la producción de antibióticos, la competencia por la rizosfera, y la producción de enzimas. Recientes investigaciones realizadas a nivel proteómico y genético sustentan que la resistencia localizada y sistémica inducida por este hongo en las plantas es una respuesta compleja que involucra cambios metabólicos, la

regulación y sobre expresión de las proteínas, y los cambios estructurales a nivel celular en las zonas inoculadas, resaltando que estas respuestas son distintas dependiendo de la especie vegetal con la que interactúa (Samolski *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2005; Shores and Harman *et al.*, 2008) . El uso de este hongo en la agricultura ha sido una herramienta acertada que ha permitido la producción sostenible de varios cultivos, en los que no sólo se mide la actividad antagónica sobre otros hongos fitopatógenos, sino que también su acción estimulante en el crecimiento vegetal. Por lo que es de gran importancia indagar más sobre sus mecanismos de acción antimicrobiana, inducción de las respuestas inmune de las plantas, y bioestimulante en el desarrollo y crecimiento vegetal; los cuales en un futuro permitirían el reemplazamiento de varios químicos a la vez que actualmente se utilizan en la agricultura, lo que conllevaría también a un ahorro económico y disminución de daños al ambiente.

El *T. harzianum* aislado ha sido explotado comercialmente para aplicarse a semillas, suelo, e inoculación radical de las plantas, éstos han sido formulados en forma de inoculantes sólidos o líquidos, los cuáles circulan en el mercado con o sin certificación. Ante esto, hay que agregar que la presencia de cualquier cepa fúngica en un sitio donde no fue aislado, presenta muchas alteraciones en su efectividad, dado que esta depende de una temperatura, condiciones del medio (tales como pH), y luminosidad similares al lugar donde fue obtenido. Por ello, es importante tomar en cuenta que muchas de las veces las cepas nativas pueden ser las idóneas para la selección en función de su efectividad.

**INMOVILIZACIÓN DE *Trichoderma harzianum* EN HIDROGELES
DE QUITOSÁN Y SU USO EN TOMATE (*Solanum lycopersicum*)
BAJO INVERNADERO**

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

**Nazario Francisco-Francisco¹, Hortensia Ortega-Ortiz², Adalberto
Benavides-Mendoza^{1*}, Homero Ramírez-Rodríguez¹, Laura Olivia Fuentes-
Lara¹ y Valentín Robledo-Torres¹**

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923.

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. * CP 25315, e-mail:

abenmen@yahoo.com.

²Centro de Investigación en Química Aplicada. Enrique Reyna 140. Saltillo,
Coahuila, México. CP 25253.

RESUMEN

Se documentó el efecto de la inmovilización de *T. harzianum* (*Th*) en hidrogeles de quitosán (H) que junto con el sustrato de turba de musgo se usaron como medio de germinación y crecimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero. El experimento se realizó en dos ciclos. En verano en los meses de julio y agosto de 2009 se establecieron 6 tratamientos, los cuales consistieron en los hidrogeles de quitosán con y sin el

hongo inmovilizado, todos mezclados con turba de musgo (P): T1) P + 6gH + Th; T2) P + 3gH + Th; T3) P + 6gH; T4) P + 3gH; T5) P + Th y T6) P. En primavera en los meses de marzo y abril de 2010 se establecieron los mismos tratamientos para la evaluación de la asimilación de CO₂. En ambos ciclos se realizaron pruebas de viabilidad de Th, al momento de la inmovilización y a los 30 y 51 días después de la siembra (dds). En el primer ciclo el crecimiento de los hongos fue similar en todos los tratamientos, en el segundo ciclo la inmovilización del hongo sobre los hidrogeles mostró superioridad al mantener por más tiempo una concentración alta de Th. En cuanto a los efectos sobre las plantas de tomate, 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. Por otro lado, no se observó efecto sobre la anatomía vascular, la presión estomática, y asimilación de CO₂ ($p < 0.05$).

Palabras clave: Quitosàn, hidrogeles, inmovilización, *T. harzianum*, tomate.

ABSTRACT

We documented the effect of the immobilization of *T. harzianum* (Th) on chitosan hydrogels (H) that together with the peat-moss substrate were applied as means of germination and growth of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) under greenhouse conditions. The experiment was conducted in two cycles. In summer (July-August) of 2009 were established six treatments, which consisted of chitosan hydrogels with and without the immobilized fungus, all mixed with

peat-moss (P): T1) P + 6 g H + Th; T2) P + 3 g H + Th; T3) P 6 g H; T4) P + 3 g H; T5) P + Th; T6) P. In spring (March and April) of 2010 the same treatments were established to assess the assimilation of CO₂. Both cycles were tested for viability of Th, at the time of the grounding and 30 and 51 days after sowing (das). In the first cycle of the fungi growth was similar in all treatments, in the second cycle the immobilization of the fungus on the hydrogels showed superiority maintaining a higher concentration of Th. Regarding the effects on tomato plants was observed that treatments with the fungus immobilized in the hydrogels produced less length of the stems and plant biomass, however the mineral content of P, Ca, and Cu was higher in treatments with the immobilized fungus. On the other hand, there was not effect on the vascular anatomy, stomatal pressure, and assimilation of CO₂ (p <0.05).

Keywords: *Chitosan, hydrogels, immobilization, T. harzianum, tomato.*

INTRODUCCIÓN

La producción intensiva de hortalizas es una actividad que demanda la protección y estimulación de los cultivos desde las etapas más tempranas con el objetivo de obtener un mayor rendimiento y calidad de producción. Esto sin embargo, ha provocado el uso desmedido de agroquímicos que con el tiempo han causado daños al ambiente y a la salud humana. Una de las alternativas para disminuir este problema es el uso de productos denominados “bioproductos” (bioplaguicidas o biofertilizantes), los cuales se formulan

añadiendo microorganismos benéficos en forma de inoculantes. Sin embargo se ha visto que el uso de estos productos comerciales no garantiza mejores resultados en la producción de cultivos en comparación por ejemplo al uso de microorganismos nativos (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2009), ya que la efectividad de estos microorganismos en el sitio de aplicación depende de varios factores que disminuyen su presencia y efectividad; por lo que comúnmente se adquieren estos productos sin saber su eficacia. Para que perdure por más tiempo una buena actividad del microorganismo es necesario inmovilizarlo, técnica empleadas comúnmente en biotecnología para el uso de microorganismos y sus subproductos, para facilitar la presencia de los microorganismos de interés en el campo de la agricultura, como lo es la inmovilización celular, que pueden en cierta forma permitir este beneficio al retener las células microbianas de interés en un soporte. Por lo general, éstas técnicas de inmovilización se llevan a cabo en materiales poliméricos sintéticos de alto costo; razón por la cual se puede limitar su aplicación extensiva en la agricultura. El quitosán (Cs) por su parte es un polímero natural obtenido de la modificación química de la quitina, que se encuentran en gran proporción en el caparazón de los crustáceos. Este biopolímero ha mostrado poseer 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), en forma de hidrogeles aplicables como reservorio de agua y nutrientes (Spinks *et al.*, 2006), y en la formación de películas para el recubrimiento de frutas (No *et al.*, 2007), además también ha sido usado para el encapsulamiento de principios activos (Vodná *et al.*, 2007), y en la inmovilización de enzimas;

debido a su baja biodegradabilidad; bajo costo; facilidad de manipulación; alta afinidad a las proteínas; el no ser tóxico; y sobre todo a su versatilidad en las formas físicas (membranas, fibras y geles) (Pereira *et al.*, 2003).

Cabe destacar que el grado de hinchamiento alcanzado por el Cs y su aplicabilidad dadas las características del hidrogel obtenido, tales como la facilidad ante la manipulación manual; resistencia mecánica; y persistencia por un período de tiempo, son distintas dependiendo del entrecruzante (Singh *et al.*, 2007) o el método utilizado para obtenerlo (Yang *et al.*, 2008).

La inmovilización celular o enzimática ha sido probada en diversos tipos de sustratos como el alginato y carrageninas (El-Katatny *et al.*, 2003), principalmente por el método de atrapamiento y por unión covalente; sin embargo para llevar a cabo la inmovilización en estos sustratos se requieren de altas temperaturas, incompatibles para muchos microorganismos, además de ser materiales de alto costo. Así mismo, el Cs por su carga positiva adquiere la propiedad de un buen soporte, dado que mediante ésta se establecen satisfactoriamente uniones electrostáticas que presentan la mayoría de los microorganismos, cargados negativamente, en su superficie y a la presencia de grupos amino a lo largo de la cadena del polímero que se unen a los grupos funcionales correspondientes a los aminoácidos de los microorganismos (Bickerstaff 1997). Por lo que es posible que mediante un método sencillo de inmovilización por adsorción en hidrogeles preparados previamente se consigan satisfactoriamente grandes cantidades de células inmovilizadas.

Por otro lado, es bien sabido de la existencia de microorganismos benéficos que protegen y estimulan a las plantas de forma natural, los cuales pudieran mediante la técnica de inmovilización mejorar su efectividad al ser complementada con alguna sustancia como el quitosán. De entre los microorganismos benéficos más conocidos la especie *Trichoderma harzianum* muestra efectividad biológica significativa (Harman *et al.*, 2004), refiriéndonos con esto a su actividad antagónica contra varios microorganismo fitopatógenos y a la estimulación del crecimiento vegetal. Sin embargo, existe poca información sobre el uso de de microorganismos inmovilizados en la agricultura, donde se estudien además los efectos complementarios por el uso de microorganismos y soportes activos como el Cs y lo que provocan en las plantas.

Estudios previos demuestran que la inducción de las respuestas de defensa provoca cambios metabólicos y anatómicos marcados en las plantas hospedero (Shoresh and Harman 2008a). Para contar con información en este campo, el objetivo del presente trabajo fue documentar la inmovilización del hongo *T. harzianum* en hidrogeles de quitosán como una alternativa a largo plazo del uso de estos microorganismo benéficos conservando su funcionamiento (actividad) para estudiar sus efectos en el crecimiento, absorción de minerales, anatomía vascular y estomática, y la actividad fotosintética en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) al usarlos junto con turba de musgo, en condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

La síntesis de los hidrogeles de Cs y la inmovilización del *T. harzianum* fueron realizados en el departamento de Plásticos en la Agricultura del Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) de Saltillo, México. Las pruebas biológicas con las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) se realizaron en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) de Saltillo, México (coordenadas geográficas latitud N 25° 22" y longitud W 101° 00" a una altitud de 1560 msnm). Las plantas fueron sembradas en un invernadero tipo túnel en dos ciclos diferentes, una en los meses de julio-agosto del 2009, y otra en primavera en los meses de marzo-abril de 2010.

Los materiales utilizados en ambos ciclos fueron quitosán (Cs) con peso molecular viscosimétrico de 200,000 y 87% de desacetilación, una cepa de *T. harzianum* (*Th*), la cual fue facilitada por el Departamento de Fitopatología de esta universidad para su reactivación en PDA, y semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Río grande.

El Cs primeramente fue purificado a partir de una solución al 2% (m/v) en ácido acético 1% (v/v), seguido de un precipitado con NaOH y lavados del polvo con etanol. La síntesis de los hidrogeles se hace a partir de una solución al 2% (m/v) del Cs purificado en ácido acético al 1% (v/v), luego se entrecruza con glutaraldehído al 50% en solución acuosa, y por último se secaron los geles a

60°C en estufa de aire circulante por 24 horas. 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 es el porcentaje de hinchamiento, *Ph* y *Ps* son el peso del hidrogel hinchado y seco respectivamente.

Posteriormente se procedió a hacer la inmovilización del *T. harzianum* en 5 g del hidrogel seco colocados en matraces erlenmeyer con caldo de papa previamente esterilizados en autoclave a 120°C, luego se agrega un mL de una suspensión de la cepa con una concentración de 1×10^9 UFC e incubando por 72 horas 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). La concentración del inóculo del hongo utilizado fue igual para todos los tratamientos con 1×10^9 UFC, los cuáles fueron mezclados con el sustrato turba de musgo (P) al momento de la siembra. Se manejaron 6 tratamientos, estos consistieron en la aplicación a 2 dosis de los hidrogeles con (P + 6 g H + *Th* y P + 3 g H + *Th*) y sin (P + 6 g H y P + 3 g H) el hongo inmovilizado por kg de sustrato, un tratamiento con la aplicación de una suspensión de la cepa al sustrato (P + *Th*), y el testigo (P), solo turba de musgo. Las variables evaluadas fueron: de crecimiento (longitud y diámetro de tallos, y número de hojas) y

biomasa vegetal; área y diámetro de los vasos del xilema así como el índice y la frecuencia estomática; contenido de minerales en las plantas; y asimilación de CO₂.

Longitud, diámetro de tallos, y número de hojas

Se realizaron 3 mediciones, a los 20, 27, y 33 días después de la siembra (dds) para la longitud y diámetro. El conteo de las hojas se realizó conjuntamente en la primera y última medición. Las mediciones de longitud se realizaron con una regla graduada desde la base del tallo hasta la base inicial del ápice. La medición del diámetro se realizó con un vernier ajustándolo 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 separa de la parte aérea, se pesan por separado y se secan en una estufa a 60°C durante 24 horas. Las muestras se almacenan para un posterior uso.

Estudio anatómico de los haces vasculares de raíz, tallo, y las hojas

Para medir los vasos del xilema, 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 que se muestrearon 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

cm² 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.

Estudio anatómico de epidermis foliar (Índice y frecuencia estomática)

Para esta variable se utilizó un microscopio a 40x de objetivo con cámara digital integrada. Se analizó el arreglo de los estomas para cuantificar el índice y la frecuencia estomática. 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 colocando ésta en un portaobjetos. Los folíolos muestreados estaban ubicados en la parte media de las hojas a 2/3 de la altura de la planta.

Contenido mineral

Se determinó el contenido mineral de las plantas a los 44 y 51 dds tomando 3 plantas al azar por cada tratamiento. La determinación de nitrógeno

fue 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 de absorción atómica Varian AA1275.

En la primavera del 2010 se establecieron los mismos tratamientos que en el primer ciclo con 3 plantas por tratamiento, los cuales se manejaron bajo las mismas condiciones donde se midió la variable **asimilación de CO₂**; para ello se utilizó el equipo LI-COR Li-6400 Portable Photosynthesis System, los datos tomados fueron: asimilación de CO₂ en mmol CO₂ m⁻² s⁻¹; conductancia estomática en mol H₂O m⁻² s⁻¹; concentración intracelular de CO₂ en mmol CO₂ mol⁻¹; y transpiración en mmol H₂O m⁻² 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 horas.

Con el objetivo de verificar la viabilidad y el crecimiento del hongo inmovilizado en los hidrogeles mezclados con la turba de musgo, 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 empleó el hongo; para lo cual se identificaron por la técnica de aislamiento y selección de microorganismos, donde al sembrar en medio de PDA fue posible aislar y observar los diferentes tipos de microorganismos presentes en la muestra.

Las variables fueron evaluadas bajo el diseño completamente al azar y en bloques al azar. Se realizó la prueba de medias con Tukey al 0.05, para ello se utilizó el software JMP (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización de los hidrogeles de quitosán e inmovilización de *Trichoderma harzianum*

Se obtuvieron hidrogeles de Cs con un porcentaje de hinchamiento del 500%, los cuales presentaron una consistencia adecuada para la manipulación manual y una humedad 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 contribuye a la disminución en el crecimiento de los microorganismos (Bickerstaff 1997), por lo que en este trabajo se evitó en lo posible el sobrecargar el hidrogel de Cs formado.

Los hidrogeles se inocularon con *T. harzianum* a una concentración de 10^9 UFC en caldo de papa a 28°C, observándose a las 72 horas una coloración verde oscuro, característica del crecimiento del hongo, comprobándose así su inmovilización en los hidrogeles de 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 mg/ml) 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 (hidrogeles) y a dos dosis diferentes.

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

Cuadro 1. Observaciones del crecimiento del hongo *T. harzianum* en medio sólido de las muestras de suelo donde se sembraron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*).

Muestras de suelo [†]	A los 30 días después de la siembra		A los 51 días después de la siembra	
	Julio-Agosto de 2009	Marzo-Abril de 2010	Julio-Agosto de 2009	Marzo-Abril de 2010
T1) P + 6 g H + <i>Th</i>	<i>T. harzianum</i> a 10 ³ UFC.	<i>T. harzianum</i> a 5 x 10 ⁵ UFC. y Bacterias a 2 x 10 ⁶ UFC.	<i>T. harzianum</i> a 10 ¹ UFC.	<i>T. harzianum</i> a 4 x 10 ³ UFC y Bacterias a 6 x 10 ⁴ UFC.
T2) P + 3 g H + <i>Th</i>	<i>T. harzianum</i> a 10 ³ UFC.	<i>T. harzianum</i> a 1 x 10 ⁶ UFC. y Bacterias presentes.	<i>T. harzianum</i> a 10 ¹ UFC.	Sólo presencia de bacterias.
T5) P + <i>Th</i>	<i>T. harzianum</i> a 10 ³ UFC.	<i>T. harzianum</i> a 5 x 10 ⁴ UFC. y Bacterias a 5 x 10 ⁵ UFC.	<i>T. harzianum</i> a 10 ¹ UFC.	Bacterias a 3 x 10 ⁶ UFC.

[†]T1 y T2: Muestras donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosán. T5: Muestras donde *T. harzianum* fue aplicado en forma de suspensión libre.

Se pudo observar que a los 51 dds del 2010 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

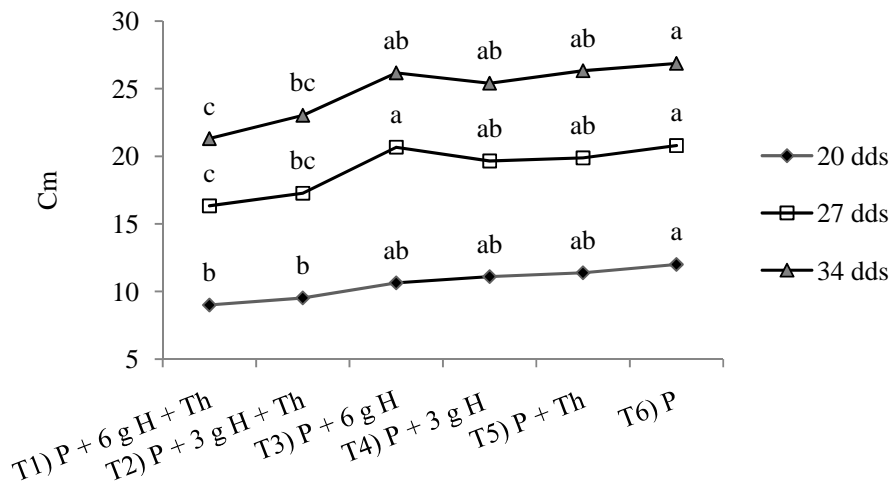
suspensión (T5), muy probablemente debido a las condiciones adversas para el crecimiento del mismo, como el pH del sustrato o la presencia de sales y a que posiblemente la presencia de una bacteria fluorescente detectada en el medio haya sido más competitiva y no le haya permitido desarrollarse adecuadamente. Al respecto, Pastucha en el 2005 observó que aplicando hidrogel de quitosán en suelos cultivados por soya, la composición cualitativa y cuantitativa de los hongos y las bacterias presentes aumentaba, observando también que la presencia de bacterias disminuía la presencia de los hongos, pero destacando en ellos el aumento de poblaciones mayormente benéficas a las plantas. Sobre esto, no existen estudios detallados que expliquen porque el mayor desarrollo de las bacterias es acompañado por un pobre desarrollo de los hongos, sin embargo se ha encontrado 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) indica que la flora bacteriana (como las *Pseudomonas*) puede estar implicada como un factor determinante en el desarrollo de la fungistasis en *T. harzianum*. Este fenómeno es atribuido a factores bióticos estrechamente ligados con 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 el citrato (Aguilar-May *et al.*, 2007).

VARIABLES DE CRECIMIENTO Y BIOMASA VEGETAL

Al aplicar el programa ANOVA en 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), el cual se va agudizando conforme pasa el tiempo (Figura 4).



*Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$). T1 y T2: Aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosán. T3 y T4: Aplicación solo de hidrogeles de quitosán. T5: Aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: Testigo.

Figura 4. Longitud de tallos en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) a los diferentes tratamientos con *T. harzianum* y/o hidrogeles de quitosán.

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

Cuadro 2. Variables de crecimiento en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) a los diferentes tratamientos con *T. harzianum* y/o hidrogeles de quitosán.

Tratamientos [†]	Número de hojas		Diámetro de tallos (mm).	
	20 días	34 días	20 días	34 días
T1) P + 6 g H + <i>Th</i>	*6.10 b	7.84 a	3.75 b	5.11 a
T2) P + 3 g H + <i>Th</i>	6.15 ab	6.63 b	3.93 b	5.18 a
T3) P + 6 g H	6.36 ab	7.42 ab	4.34 ab	5.14 a
T4) P + 3 g H	6.68 ab	7.73 a	4.33 ab	5.33 a
T5) P + <i>Th</i>	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
C.V.	14.5%	13.5 %	18.9%	13.9%

*Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$).

[†]T1 y T2: Aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosán. T3 y T4: Aplicación solo de hidrogeles de quitosán. T5: Aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: Testigo.

En el ANOVA de la variable producción de biomasa se observó diferencia significativa solamente en el peso fresco y seco aéreo, la prueba de medias muestra que el tratamiento T1 produce una menor 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 muestra ser estimulador en el crecimiento vegetal (Nge *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que la resistencia sistémica de una planta, provocado por la presencia de inductores, está mediada por diferentes vías de transducción de señales, una ruta asociada y dependiente del ácido salicílico (AS), y por una ruta independiente del AS ligada al ácido jasmónico (JA) y el etileno (Shoresh *et al.*, 2005), estos últimos compuestos exhiben algunas actividades similares al ácido abscísico (ABA) como lo es el cese en el crecimiento vegetal (Srivastava 2002), lo que pudo haber ocasionado esta respuesta, y aún más por la presencia de varios inductores a la vez, Cs y *T. harzianum*.

Cuadro 3. Producción de biomasa vegetal en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) a los diferentes tratamientos de *T. harzianum* y/o hidrogeles de quitosán.

Tratamientos [†]	PFR [#] (g).	PSR (g).	PFA (g).	PSA (g).
T1) P + 6 g H + <i>Th</i>	*4.09 a	0.50 a	20.20 b	2.86 b
T2) P + 3 g H + <i>Th</i>	4.57 a	0.58 a	23.81 ab	3.44 ab
T3) P + 6 g H	5.36 a	0.61 a	23.92 ab	3.47 ab
T4) P + 3 g H	5.12 a	0.63 a	22.62 ab	3.57 ab
T5) P + <i>Th</i>	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
C.V.	43.0%	34.2%	19.0%	21.0%

*Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$).

[†]T1 y T2: Aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosán. T3 y T4: Aplicación solo de hidrogeles de quitosán. 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.

Estudio anatómico de la epidermis foliar y de los haces vasculares

Cuadro 4. Estudio anatómico de haces vasculares a los 42 días en tallo, raíz y hoja, y de estomas a los 35 días en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) a los diferentes tratamientos con *T. harzianum* y/o quitosán.

Tratamiento [†]	Área vascular (%).	Área de vasos del xilema (μm^2).	Diámetro de vasos del xilema (μm).	Índice estomático (%).	Frecuencia estomática (estomas/ mm^2).
T1) P + 6 g H + <i>Th</i>	*27.42 a	1816.23 a	35.42 a	16.92 a	146.8 a
T2) P + 3 g H + <i>Th</i>	28.36 a	1712.22 a	40.27 a	16.93 a	149.2 a
T3) P + 6 g H	26.20 a	1991.62 a	41.40 a	17.65 a	136.2 a
T4) P + 3 g H	30.99 a	1953.46 a	43.85 a	15.51 a	157.8 a
T5) P + <i>Th</i>	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
C.V.	16.2%	16.6 %	12.4%	12.5%	22.0%

*Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$).

[†]T1 y T2: Aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosán. T3 y T4: Aplicación solo de hidrogeles de quitosán. T5: Aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: Testigo.

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.

Contrario a estos resultados, la aplicación foliar de quitosán ha mostrado la habilidad de reducir la transpiración de plantas de pimiento (*Bell pepper*) y con ello aumentando el uso eficiente del agua, a través de la oclusión parcial o total de los estomas (Bittelli *et al.*, 2001). Por otro lado, 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, estas van desde la oclusión de las células corticales y la producción de precursores para la formación de estructuras que hacen más rígida la pared celular como la lignina (Yedidia *et al.*, 1999), en la que si bien han sido relacionados como una respuestas de la planta para afrontar eficazmente el ataque de los fitopatógenos pudieran ser, en casos extremos, cambios estructurales desfavorables para la productividad de la planta al usar el hongo con alguna sustancia con actividad biológica como el quitosán, al provocar estos, mayores costos metabólicos Sin embargo en estos estudios no se encontró modificación alguna.

Contenido de minerales

Cuadro 5. Contenido de minerales en base a materia seca en plantas de tomate (*Solanum Lycopersicum*) a los diferentes tratamientos con *T. harzianum* y/o hidrogeles de quitosán.

Tratamiento [†]	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Cu (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Na (%)
T1) P+6 g H+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+3 g H+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+6 g H	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+3 g H	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
C.V	13%	17%	20%	26.9%	33.8%	34.9%	39.6%	29.7%	72.7%	27.7%

*Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$).

[†]T1 y T2: Aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosán. T3 y T4: Aplicación solo de hidrogeles de quitosán. T5: Aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: Testigo.

Al checar en la materia seca, solamente se observó diferencia significativa en el contenido de los minerales P, Ca, y Cu (Cuadro 5). En general, el tratamiento (T1) donde se tenía la presencia del hongo inmovilizado a mayor dosis de hidrogel es la que muestra un alto contenido 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.

Asimilación de CO₂

No se observó diferencia estadística en ninguna de las mediciones de la variable asimilación de CO₂ (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 CO₂ (Khan *et al.*, 2002); el cual no está completamente entendido.

Cuadro 6. Variable fotosintética en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) a diferentes tratamientos con *T. harzianum* y/o hidrogeles de quitosán.

Tratamiento [†]	Tasa Fotosintética (mmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	Conductancia (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	CO ₂ Intracelular (mmol CO ₂ mol ⁻¹)	Transpiración (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)
T1) P+6 g H+ <i>Th</i>	*10.72 a	0.46 a	282.5 a	15.06 a
T2) P+3 g H+ <i>Th</i>	10.11 a	0.55 a	289.2 a	16.18 a
T3) P+6 g H	10.26 a	0.44 a	280.0 a	14.12 a
T4) P+3 g H	10.26 a	0.53 a	286.9 a	16.23 a
T5) P+ <i>Th</i>	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
C.V.	9.9%	36.6%	7.5%	15.3%

*Medias con la misma letra no son diferentes estadísticamente (Tukey $p \leq 0.05$).

[†]T1 y T2: Aplicación de tratamientos donde *T. harzianum* fue inmovilizado en los hidrogeles de quitosán. T3 y T4: Aplicación solo de hidrogeles de quitosán. T5: Aplicación de *T. harzianum* en forma de suspensión libre. T6: Testigo.

Por otro lado Shoresh 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 proteínas 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.

CONCLUSIONES

- ❖ Se obtuvieron hidrogeles de quitosán con una capacidad de hinchamiento de hasta 5 veces su volumen inicial, estos mostraron compatibilidad con el hongo *Trichoderma harzianum*.
- ❖ La inmovilización de este hongo fue posible al mostrar presencia por más tiempo en los sustratos con los hidrogeles.
- ❖ El uso de este preparado propició un efecto de disminución en el crecimiento; menor formación de biomasa y mayor contenido de P, Ca y Cu en plantas de tomate.
- ❖ No se presentó afectación negativa de la anatomía vascular, estomática y de la actividad fotosintética en las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en presencia de los hidrogeles.
- ❖ El método de inmovilización es una forma de manejo viable de los microorganismos benéficos en la producción de cultivos bajo condiciones de invernadero.

LITERATURA CITADA

- Abou-Sereih, A. Neven, 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*. *Journal of Applied Sciences Research*, **3**(6), 450-455.
- Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T. & Harman, G. E. 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.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Bosques-Molina, E. y Sánchez-Domínguez, D. 2005. Quitosano: una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, **7**, 1 – 6.
- Bickerstaff, G. F. 1997. Methods in biotechnology, Immobilization of enzymes and cells. Humana Press Inc., Totowa, N.J. 1, 1–11.
- Bittelli, M., Flury, M., Campbell, G. S. & Nichols, E. J. 2001. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Meteorology* **107**, 167–175.
- Boer, W., Verheggen, P., Klein, G.J.A., Kowalchuk, G.A. and Van-Veen, J.A. 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis, *69*(2): 835 – 844.
- Cartaya, O., Peniche, C. y Reynaldo, I. 2009. Polimeros naturales recolectores de iones metálicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. **10**(1), 81 – 94.
- Chircov, S. N., A. V. Ilina, N. A. Surgucheva, E. V. Letunova, Y. A. Varitsev, N. Y. Tatarinova and V. P. Varlamov. 2001. Effect of Chitosan on Systemic Viral Infection and Some Defense Responses in Potato Plants *Russ. J. Plant Physiol.* **48**, 774-779.
- Cho, M. K., No, H. K. and Prinyawiwatkul. W. 2008. Chitosan Treatments Affect Growth and Selected Quality of Sunflower Sprouts. *Journal of Food Science*. **73**, 70 – 78.
- Douglas, J. S. **1976**. in: Advanced guide to hydroponics. *Drake Publishers, Inc. New York*. 195.

- El-Katatny, M. H., Hetta, A. M., Shaban, G. M. and El-Komi, H. M. 2003. Improvement of Cell Wall Degrading Enzymes Production by Alginate Encapsulated *Trichoderma* spp. *Food Technol. Biotechnol.* 41 (3) 219–225.
- Falcón-Rodríguez, A. B., Costales-Menéndez, D., Ortega-Delgado, E., León-Díaz, O., Cabrera-Pino, J. C. and Martínez-Téllez, M. A. 2007. Evaluation of chitosan as an inhibitor of soil-borne pathogens and as an elicitor of defence markers and resistance in tobacco plants. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 5(4): 533 – 541.
- Felinto, M. C. F. C., Parra, D. F., da Silva, C. C., Angerami, J., Oliveira, M. J. A. and Lugao, A. B. 2007. The swelling behavior of chitosan hydrogels membranes obtained by UV – and γ -radiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.* 265, 418 – 418.
- Goncalves, V. L., Laranjeira, M. C. M. and Fávere, V. T. 2005. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 15, 6 – 12.
- Goosen-Mattheous, F. A. 1997. Applications of chitin and chitosan. Technomic Publishing Co, Inc. 7-12.
- Gunasekaran, S., Wang, T. and Chai, C. 2006. Swelling of pH-sensitive chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science.* 102, 4665 – 4671.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito. M. 2004. *Trichoderma* species—Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology.* 2, 43 – 56.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87, 4–10.
- Jen, A. C., Wake, C. W. and Mikos, A. G. 1996. Review: Hydrogels for Cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering,* 50: 357 – 364.
- 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. Brief Communication. 40(4), 621-624.
- Myskow, W. Zwiaski miedzy aktywnoscia biologiczna gleby, a jej zyznoscia urodzajnoscia. *Mat. Szkol. Biologiczne metody podnoszenia zyznosci i urodzajnosci gleb.* Pulawy, 51 – 53 (1989).
- Nge, K. L., N. Nwe, S. Chandkrachang and W. F. Stevens. 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Journal of Plant Science* 170, 1185-1190.
- No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W. and Xu, Z. 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *Journal of food science.* 75(5), 87 – 100.

- Ortega-Ortiz H., A. Benavides-Mendoza, A. Flores-Olivas, A. Ledezma-Pérez. 2003. Use of the Interpolyelectrolyte Complexes of Poly(acrylic acid)-Chitosan as Inductors of Tolerance Against Pathogenic Fungi in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. Floradade). *Macromol. Biosci.* 3(10), 566-570.
- Pastucha, A. 2005. The effect of chitosan on the formation of microorganism communities in the rhizosphere soil of soybean. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 4(2): 69 – 77.
- Percot, A., Vitón, C. H. and Domard, A. Optimization of chitin extraction from shrimps shells. 2003. *Biomacromolecules* 4, 12 – 18.
- Pereira, E. B., Zanin, G. M. and Castro, H. F. 2003. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 20(04), 343 – 355.
- Rabea, E. I., Badawy, M., Stevens, C. V., Smagghe, Guy. and Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. 4, 1457 – 1465.
- Rogel-Hernández, E., Licea-Claveríe, A., Cornejo-Bravo, J. M. and Karl-Friedrich, A. 2003. Preparación de hidrogeles anfífilos sensibles a diferentes valores de pH utilizando monómeros ácidos con espaciadores hidrofóbicos. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47(3): 251 – 257.
- Samolski, I., De Luis, A., Vizcaíno, J. A., Monte, E. and Belén, S. M. 2009. Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiology*. 9, 2 – 14.
- Sánchez, B. A., Sibaja, B. M., Vega, B. J. y Madrigal, C. S. 2007. Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomedicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 8(4), 241 – 267.
- Santoni, N., Matos, M., Muller, K. C., Nicola, H., Sabino, M. y Muller, A. 2008. Caracterización de hidrogeles de quitosano entrecruzados covalentemente con genipina. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 9(3), 326 – 330.
- SAS Institute Inc. 2002. JMP User's Guide, Version 5.0.1 SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Shoresh, M. and Harman, G. E. 2008. The relationship between increased growth and resistance inducen in plants by root colonizing microbes. *Plant signalling & Behavior*. 3, 737 – 739.
- Shoresh, M., Yedidia, I. and Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*. 95: 76–84.

- Singh, A., Narvi, S. S., Dutta, P. K. and Pandey, N. D. 2006. External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde. *Bull. Mater. Sci.* 29 (3), 233 – 238.
- Spinks, G. M., Lee, C. K., Wallace, G. G., Kim, S. I. and Kim, S. J. 2006. Swelling behavior of chitosan hydrogels in ionic liquid-water binary systems. *Langmuir*. 22(22), 9375 – 9379.
- Srivastava, L. M. 2002. Plant Growth and Development: Hormones and Environment. *Elsevier Science*. USA.
- Tang, Z. X. and Qian, J. 2007. Use of chitosan gel for the purification of protein. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50(2), 299 – 309.
- Vodná, L., Bubeníková, S. and Bakos, D. 2007. Chitosan based hydrogel microspheres as drug carriers. *Macromolecular Bioscience*. 7, 629 – 634.
- Yang, X., Zhu, Z., Liu, Q. and Chen, X. 2008. Thermal and Rheological properties of Poly(vinyl alcohol) and water-soluble chitosan hydrogels prepared by a combination of γ -ray irradiation and freeze thawing. *Journal of Applied Polymer Science*. 109, 3825 – 3830.
- 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**, 1061–1070.
- Zhao, L. and Mitomo, H. 2008. Adsorption of heavy metal ions from aqueous solution onto chitosan entrapped CM-Cellulose hydrogels synthesized by irradiation. *Journal of Applied Polymers Science*. 110, 1388 – 1395.