

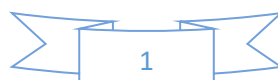
**Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Vicerrectoría de Investigación y Extensión  
Dirección de Proyectos  
Informe final de proyecto de investigación**

**Documento 1**

**Mejoramiento de las propiedades biológicas del suelo con la incorporación de microorganismos rizosféricos, para el incremento de la productividad en el cultivo de la cebolla en Llano Grande y Tierra Blanca de Cartago.**

**MAP. Jaime Brenes M.  
Dr. William Rivera M.  
MSc. Claudia Zúñiga V.  
MSc. Luis Alvarado Marchena**

**2018 - 2019**



## 2. Tabla de contenido

<b>Nombre del proyecto</b>	<b>1</b>
<b>Código del proyecto</b>	<b>3</b>
<b>Autores</b>	<b>3</b>
<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Objetivo 1</b>	<b>5</b>
<b>Objetivo 2</b>	<b>11</b>
<b>Objetivo 3</b>	<b>21</b>
Correo de aceptación del artículo	<b>21</b>
Artículo completo	<b>22</b>
<b>Agradecimientos generales del proyecto</b>	<b>41</b>

Código: **Código del Proyecto: 1510098**

**Nombre del proyecto:** “Mejoramiento de las propiedades biológicas del suelo con la incorporación de microorganismos rizosféricos, para el incremento de la productividad en el cultivo de la cebolla en Llano Grande y Tierra Blanca de Cartago”.

#### **4. Autores y direcciones**

MAP. Jaime Brenes M. Coordinador. Escuela de Biología. [jabrenes@itcr.ac.cr](mailto:jabrenes@itcr.ac.cr)

Dr. William Rivera M. Escuela de Biología. [wirivera@itcr.ac.cr](mailto:wirivera@itcr.ac.cr)

MSc. Claudia Zúñiga V. Escuela de Biología. [czuniga@itcr.ac.cr](mailto:czuniga@itcr.ac.cr)

MSc. Luis Alvarado Marchena. Escuela de Biología. [lalvarado@itcr.ac.cr](mailto:lalvarado@itcr.ac.cr)

#### **Resumen**

La cebolla es un cultivo hortícola de mucha importancia para el país, en especial para las pequeñas economías y encadenamientos productivos de mercado interno.

El proyecto consistió en la evaluación de varias especies de *Trichoderma sp* para observar el efecto sobre el rendimiento, elongación de las raíces y sus efectos sobre la interacción con las células del cultivo y su recomendación para futuras siembras de cebolla.

En el proyecto se realizó un análisis microbiológico del suelo de las parcelas, en donde se evidencio la presencia de microorganismos patógenos al cultivo de la cebolla, además de una baja presencia de microorganismos benéficos, debido a la alta utilización de agroquímicos y al bajo porcentaje de materia orgánica. Además, se evaluó el efecto de la aplicación de varias especies de *Trichodermas sp* a almácigos de cebolla y a plantación, en donde se comprobó que *T..asperellum* es la especie que presentó los mejores rendimientos y mayor desarrollo radicular.

En los ensayos *in vitro* *T. harzianum* es la especie que presenta la mayor elongación de raíz, seguido por *T. virens*, pero a nivel de campo *T. asperellum* es la que presenta una mayor elongación radical. A nivel celular se demostró que los tratamientos con *Trichoderma sp*, las células alcanzan un mayor grosor y una mayor madurez que el control. El objetivo de esta investigación fue mejorar las propiedades biológicas del suelo con la incorporación

de microorganismos rizosféricos para el incremento de la productividad en el cultivo de la cebolla en Llano Grande y Tierra Blanca de Cartago.

Palabras clave: cebolla, microorganismos rizosféricos, promoción del crecimiento, inducción de defensas, productividad

## **Objetivo Específico 1: Incorporar microorganismos rizosféricos para mejorar las propiedades biológicas del suelo en el cultivo de la cebolla**

### **Introducción**

El suelo es uno de los recursos más importantes para el agricultor, el cual se ve sometido a factores ambientales adversos y a programas intensivos de producción, que van ocasionado un desgaste de los nutrientes, pérdida de la capa arable y pérdida de los microorganismos benéficos. La agricultura intensiva y la poca rotación de los cultivos favorecen el empobrecimiento, pasando en poco tiempo a convertirse en suelos no aptos para la producción. Aparte de esto, se ve sometido también a las condiciones climáticas adversas, que ocasionan daños por escorrentía o erosiones hídricas, factor muy importante de pérdida de suelo en la zona norte de Cartago en épocas de lluvia, o por el viento. Cultivar intensivamente, favorece la extracción de nutrientes e incrementa la pérdida de microorganismos, volviéndose el cultivo dependiente de los fertilizantes y los agroquímicos, para obtener producciones rentables. Un factor importante y poco atendido por los productores, es el referente a las poblaciones de microorganismos benéficos presentes en la rizosfera, ya que las prácticas de aplicación de agroquímicos reducen los microorganismos del suelo.

### **Marco teórico**

La rizosfera es un complejo ecosistema que consiste de una zona muy delgada (2mm) alrededor de la raíz de la planta. Numerosos estudios han localizado un amplio rango de organismos que incluyen hongos, bacterias y nematodos, así como parásitos de las raíces de las plantas y tiene un efecto positivo o negativo sobre el bienestar de la planta. Las plantas por su parte, producen y secretan una variedad de metabolitos en ese lugar, que afecta a este ecosistema. Los llamados metabolitos primarios como ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos, pero también metabolitos secundarios que se denominan productos naturales de plantas. En la rizosfera, varios compuestos funcionan como mediadores de las interacciones de las plantas con otras plantas, animales y microorganismos. El conocimiento sobre estas moléculas señal se está incrementando con rapidez. Lo que se busca es optimizar la respuesta de las plantas para que estas moléculas promuevan un incremento en la producción (Zhang et al., 2015).

## **Metodología**

Se realizó un diagnóstico microbiológico de los suelos de las fincas seleccionadas en Llano Grande y Tierra Blanca de Cartago, para determinar la presencia de microorganismos benéficos y fitopatógenos, basados en la metodología descrita por Brenes et al 2012. Se evaluó los siguientes microorganismos *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. virens* y un testigo, basados en el desarrollo de la raíz y la productividad del cultivo.

En el laboratorio se prepararon los medios de cultivo para hongos y se procedió a la multiplicación de los microorganismos, hasta obtener los cultivos puros de hongos para ser aplicados. Las fincas se ubicaron en Llano Grande y Tierra Blanca de Cartago.

## **Resultados**

En las fincas seleccionadas una en Tierra Blanca y la otra de Llano Grande se realizó un análisis de muestras de suelo para determinar la presencia de microorganismos benéficos y patógenos (Anexo 1).

De los análisis de ambas fincas se puede observar que los niveles de microorganismos patógenos son muy altos y los resultados los microorganismos benéficos es muy bajo, al igual que la cantidad de materia orgánica.

## **Discusión**

En ambas muestras analizadas se observó que el suelo presentó una oxigenación adecuada, pero se debe de tener un plan de mejoramiento del suelo con la incorporación de materia orgánica, para brindar a los microorganismos un sustrato para su reproducción, también se presentó un nivel normal de hongos no patógenos. Esta materia orgánica servirá para mejorar la percolación y aireación, favoreciendo el crecimiento de algunos macroorganismos.

No se detectó presencia de organismos actinomicetos, esto es importantes de considerar debido a que ayudan a la descomposición de la materia orgánica y además tienen funciones como agentes de control biológico contra insectos, bacterias y nematodos, debido a presencia de sustancias antibióticas como estreptomycin, aureomicina, terramicina, cloromicetina y tetraciclina, los actinomicetos ayudan a la supresión de enfermedades.

Se presentó un nivel de inóculo de hongos patógenos en lo mínimo permitido, estos son patógenos propios de cebolla y además presentes en los suelos de vocación hortícola de

la zona norte de Cartago, como lo son *Pythium spp*, *Phytophthora spp* y *Fusarium spp*, estos tres hongos son de relevante importancia en la mayoría de cultivos.

En general, el suelo presenta índices con una oxigenación adecuada y con indicadores de sanidad en niveles adecuados, además se presentan niveles altos de *Pythium spp*, e inóculos altos de *S. cepivorum* y *S. terrestres*, que son patógenos muy importantes en el cultivo de cebolla por las pérdidas que ocasionan. En las muestras de suelo, analizadas se encontró *Trichoderma aspellum*, *T. harzianum* y *T. virens*, por lo que se decidió evaluar estos tres microorganismos, en los almácigos y campo.

## **Conclusiones**

Los suelos muestreados en ambas fincas presentan los hongos patógenos importantes en cebolla, además presentan bajos niveles de actinomicetos, que son importantes en la descomposición de materia orgánica.

Se debe de implementar un programa de manejo de enfermedades, con la utilización de microorganismos, para obtener productos más inocuos.

*Trichoderma sp* mostró ser un hongo importante en el incremento de la masa radicular, longitud de las raíces y el incremento de la producción.

## **Recomendaciones**

Se recomienda la aplicación de microorganismos benéficos en la preparación de los almácigos, a la siembra y en el transcurso del desarrollo del cultivo, ya que estos van a ayudar en el control de los microorganismos patógenos.

## ANEXO 1. Análisis microbiológicos de muestras de suelos de Tierra Blanca y Llano Grande

Cartago, 13 de febrero, 2019

**Ubicación: Tierra Blanca de Cartago**

**Análisis microbiológico de suelo**

Cantidad de muestras y etiquetas:

Resultados análisis 1: **Suelo Planta Sana**

Muestra	Bacterias aerobias (UFC/g)	Bacterias anaerobias (UFC/g)	Hongos totales (UFC/g)	Actinomicetos (UFC/g)
1	$> \times 10^7$	$1.5 \times 10^6$	$5.2 \times 10^5$	0
<b>Observac.</b>	Cantidad alta	Cantidad alta	Cantidad normal.	No hay

Muestra	<i>Trichoderma spp</i> (UFC/g)	<i>Pythium spp</i> (UFC/g)	<i>Phytophthora spp</i> (UFC/g)	<i>Fusarium spp</i> (UFC/g)
1	$1.4 \times 10^1$	$2.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	$3.5 \times 10^4$
<b>Observac.</b>	Adecuado	Inadecuado	Inadecuado	Inadecuado

Muestra	<i>S. cepivorum</i> (esclerocios/g)	<i>S. terrestris</i> (UFC/g)	Otros patógenos
1	0.02	$5.0 \times 10^6$	No hay
Observaciones	Inadecuado	Inadecuado	

- A- Oxigenación inadecuada.
- B- Nivel normal de hongos no patógenos. Función normal de reciclaje de materia orgánica y posible presencia de hongos patógenos
- C- No se detectó presencia de organismos actinomicetos; incapacidad regular de supresión de enfermedades.
- D- Hongos indicadores de control biológico en nivel adecuado.
- E- Inóculo de *Pythium spp* en nivel inadecuado.
- F- Inóculo de *Phytophthora spp* en nivel adecuado
- G- Inóculo de *Fusarium spp* en nivel adecuado.
- H- En general, un suelo con oxigenación adecuada y con indicadores de sanidad en niveles adecuados, sin embargo tiene un nivel alto de *Pythium spp* y bajo de actinomicetos.
- I- Los patógenos propios del agroecosistema de cebolla se encuentran en nivel adecuados (bajos).
- J- Hay inóculos altos de *S. cepivorum* y *S. terrestris*.



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
Centro de Investigación en Biotecnología.  
Laboratorio de Control Biológico

Cartago, 13 de febrero, 2019

Ubicación: Varillal de Llano Grande de Cartago

Análisis microbiológico de suelo

Cantidad de muestras y etiquetas:

Resultados análisis 1: Suelo Planta Sana

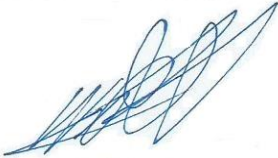
Muestra	Bacterias aerobias (UFC/g)	Bacterias anaerobias (UFC/g)	Hongos totales (UFC/g)	Actinomicetos (UFC/g)
1	$> \times 10^9$	$1.48 \times 10^6$	$4.82 \times 10^5$	0
Observac.	Cantidad alta	Cantidad alta	Cantidad normal.	No hay

Muestra	<i>Trichoderma spp</i> (UFC/g)	<i>Pythium spp</i> (UFC/g)	<i>Phytophthora spp</i> (UFC/g)	<i>Fusarium spp</i> (UFC/g)
1	$1.4 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$	0	0
Observac.	Adecuado	Inadecuado	No hay	No hay

Muestra	<i>S. cepivorum</i> (esclerocios/g)	<i>S. terrestris</i> (UFC/g)	Otros patógenos
1	0.0001	$1.2 \times 10^2$	No hay
Observaciones	Adecuado	Adecuado	

- A- Oxigenación adecuada.
- B- Nivel anormal de hongos no patógenos. Función anormal de reciclaje de materia orgánica y posible presencia de hongos patógenos
- C- No se detectó presencia de organismos actinomicetos; incapacidad regular de supresión de enfermedades.
- D- Hongos indicadores de control biológico en nivel adecuado.
- E- Inóculo de *Pythium spp* en nivel inadecuado.
- F- Inóculo de *Phytophthora spp* en nivel adecuado
- G- Inóculo de *Fusarium spp* en nivel adecuado.
- H- En general, un suelo con oxigenación adecuada y con indicadores de sanidad en niveles adecuados, sin embargo tiene un nivel alto de *Pythium spp* y bajo de actinomicetos.
- I- Los patógenos propios del agroecosistema de cebolla se encuentran en nivel adecuados (bajos).

Atentamente,



**ANEXO 2-** Aplicaciones de *Trichoderma sp* en las parcelas de los agricultores



**Figura 1.** Aplicación de *Trichoderma sp* en almácigos de cebolla variedad Maragogui en Tierra Blanca



**Figura 2.** Aplicación de *Trichoderma sp* en plantación de cebolla variedad Alvara en Llano Grande, Cartago

## **Objetivo Específico 2: Evaluar el efecto de los microorganismos rizosféricos en el sistema radicular y la productividad de cebolla**

### **Introducción**

La explotación a gran escala de las interacciones rizosféricas es esencial para aumentar la capacidad de los agroecosistemas para la adaptación al cambio climático y también para adoptar estrategias novedosas que maximicen la producción de alimentos bajo condiciones adversas (Dubay et al., 2016)

En este proyecto se dará énfasis al incremento en el sistema radicular de la cebolla, ya que, si la planta presenta una raíz con mayor desarrollo, se adaptará mejor a las condiciones adversas del medio y al ataque de patógenos. El sistema radical de la cebolla tiene gran afinidad por las asociaciones con micorrizas, lo que favorece la capacidad de absorción (Granados, 2013). La comprensión de las interacciones entre la planta, los microorganismos y el suelo con el cambio climático es esencial para conocer los cambios que se deban aplicar para modificar el ambiente de la rizosfera y lograr la sostenibilidad en la producción. El reducido sistema radicular de la cebolla, estimula una baja absorción tanto de nutrientes como de agua, lo cual genera que sea una planta poco competitiva en contraste con las malezas o plantas espontáneas. En este contexto, se busca obtener una metodología que le brinde al agricultor opciones para mejorar esta rizosfera mediante la incorporación de microorganismos benéficos, lo que traerá mejoras en la producción del cultivo. Se conoce que el éxito de un patógeno está influenciado por la comunidad microbiana del suelo, en el cual tiene lugar la infección, por lo que actualmente se le está dando mucho énfasis al manejo de la rizosfera de las plantas. La cual, entre sus efectos directos induce la resistencia sistémica y acelera la activación de los mecanismos de defensa ante las enfermedades (Berendsen et al. 2012; Garcia et al., 2016)).

### **Marco teórico**

La rizosfera es una zona de gran actividad microbiana y la población de microorganismos presente en ese ambiente es relativamente diferente de los alrededores, debido a los exudados de la raíz, que son la fuente de nutrición del crecimiento de microorganismos, estas interacciones pueden influenciar significativamente el crecimiento y desarrollo de la planta (Nadeem et al., 2014).

La adquisición y el intercambio de los nutrientes del suelo a través de las interacciones entre plantas y hongos en la rizosfera son clave para la agricultura y cambios ambientales. La mejora de los cultivos y la nutrición mineral usando hongos simbioses ha sido

ampliamente descrita (Garcia et al., 2016). Los microorganismos que colonizan esta zona generalmente incluyen bacterias, algas, hongos, protistas y actinomicetos. Es evidente el mejoramiento en el crecimiento y desarrollo de las plantas por aplicación de poblaciones de estos microorganismos.

Los mecanismos que promueven el crecimiento vegetal incluyen: la fijación de nitrógeno, la solubilización del fósforo, la producción de sideróforos, así como la protección por enzimas como las desaminasas, quitinasas y glucanasas. Los hongos, además de las bacterias, representan una porción significativa de la rizosfera, ya que muchos capacitan a las plantas para que absorban agua y nutrientes más eficientemente. Estos, también protegen a la planta del estrés abiótico y también mejoran la tolerancia a la salinidad, sequía, inundación y la toxicidad por metales pesados (Nadeem et al., 2014). La plasticidad en el desarrollo del sistema radicular es crítica para la adaptación de las plantas al ambiente. Las señales externas controlan el crecimiento y la diferenciación, así como las asociaciones simbióticas entre microorganismos y plantas, donde muchas proteínas desempeñan un papel muy importante, regulando la función de las citocininas y auxinas (Fonouni-Farde et al, 2016).

## **Metodología**

A las parcelas que se les realizó el análisis microbiológico, se les aplicó los microorganismos para evaluar su efecto sobre el crecimiento de la raíz y la producción.

Se estableció un diseño de bloques completos al azar, con seis repeticiones por cada bloque y en donde las variables independientes fueron los siguientes tratamientos: *T. asperellum* (T1), *T. harzianum* (T2), *T. virens* (T3) y el control (T4) con el paquete tradicional de agroquímicos usado por el productor.

Los tratamientos se aplicaron mediante aspersión mecánica con bomba de espalda utilizando una dosis de 4kg/ha. Las aplicaciones se realizaron en el día cero (siembra de las semillas), en el día 30 (trasplante), el día 45, el 60, el 75 y el 90. Las variables evaluadas (dependiente) son la longitud de la raíz principal (la raíz más larga que se observe) y el peso de las raíces secas al final del ciclo del cultivo. El análisis estadístico se realizó por medio del análisis de varianza y se determinó las diferencias encontradas entre los tratamientos.

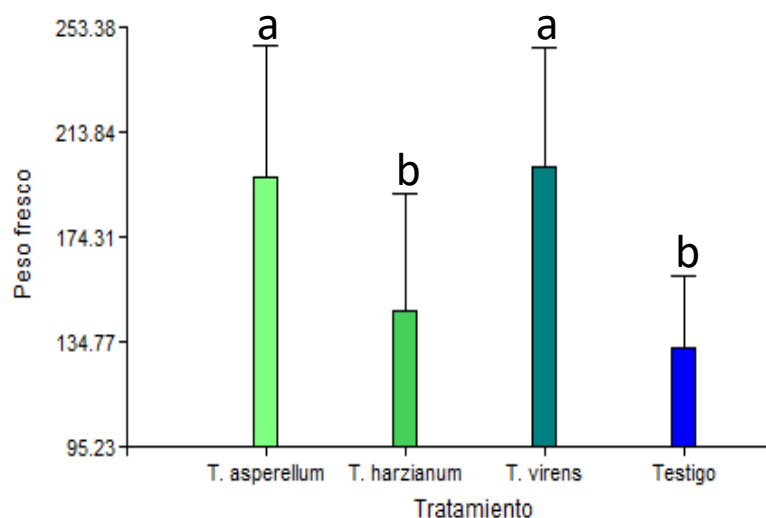
La segunda variable a evaluar fue: a) el peso fresco de las cebollas cosechadas al final del ciclo de cultivo y b) el peso seco de las cebollas luego de 5 días en un túnel plástico, para determinar diferencias en el rendimiento de los tratamientos aplicados. Se tomaron 30

mediciones por tratamiento y se obtuvo un promedio para cada repetición de cada bloque. El análisis estadístico se realizó por medio del análisis de varianza y se determinarán las diferencias encontradas entre los tratamientos. Estas diferencias permitieron determinar las diferencias entre tratamientos.

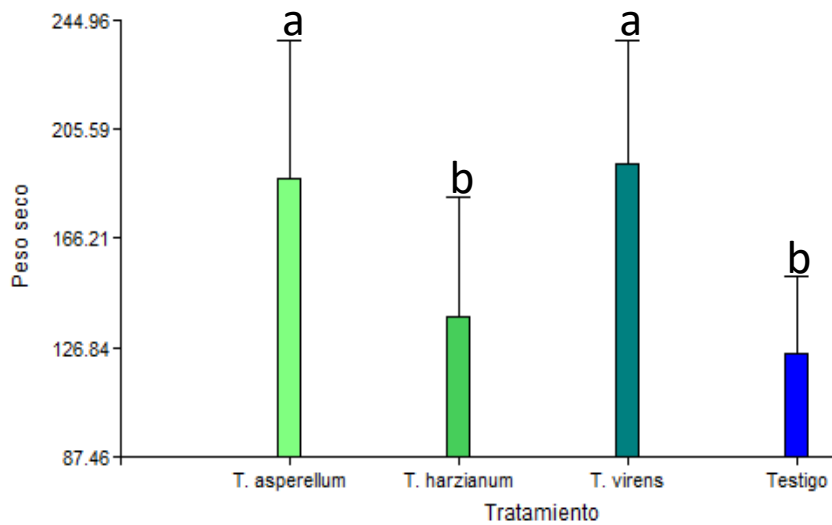
## Resultados

En la parcela de Tierra Blanca se cultivó la variedad Maragogui, la cual es una variedad que se está introduciendo en el mercado nacional, esta variedad es más precoz, por lo que el manejo de la fertilización es diferente a otras variedades que los agricultores han cultivado

En la figura 1 y 2 se puede observó como *T. asperellum* y *T. virens* son microorganismos que producen los mayores rendimientos en peso fresco y seco, aunque estadísticamente no hay diferencia entre *T. harzianum* y el testigo, se observa que *T. harzianum* tiene mayores rendimientos que el testigo, y esto trasladado a kilos de producción, significa una mayor utilidad para el agricultor.

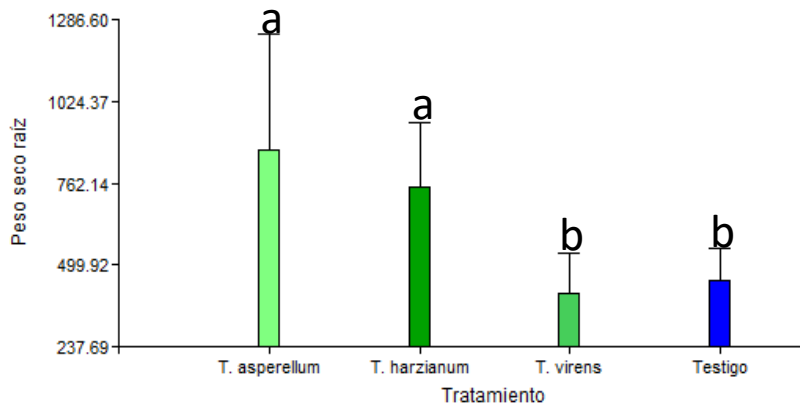


**Figura 1.** Promedio de los pesos frescos (gramos) en 30 bulbos de cebolla de la variedad Maragogui en Tierra blanca de Cartago, según el análisis estadístico Kluskal-Wallis.

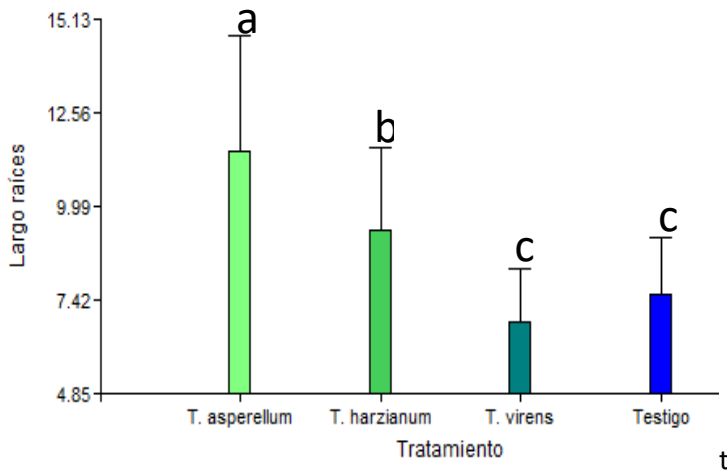


**Figura 2.** Promedio de pesos secos (gramos) de los bulbos de 30 cebollas de la variedad Maragogui en Tierra Blanca de Cartago, según el análisis estadístico Kluskal-Wallis.

En la figura 3 y 4 se puede observar como *T. asperellum* y *T. harzianum* son los microorganismos que producen las raíces más largas y el mayor peso de raíces secas, mientras que entre *T. virens* y el testigo nos hay diferencia significativa.



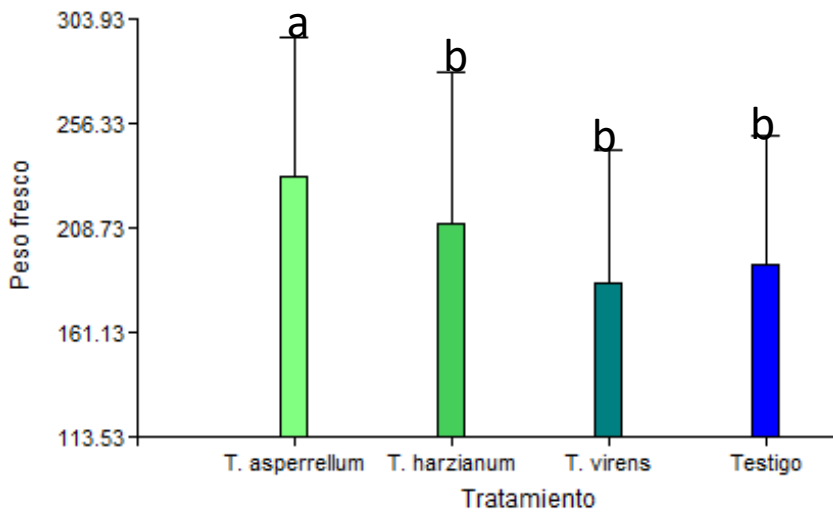
**Figura 3.** Promedio del peso seco (miligramos) en raíces de cebolla de la variedad Maragogui en Tierra Blanca de Cartago, según el análisis estadístico Kluskal-Wallis.



**Figura 4.** Promedio del largo en (centímetros) de las raíces de cebolla variedad Alvara en Tierra Blanca de Cartago, según el análisis estadístico Kluskal-Wallis.

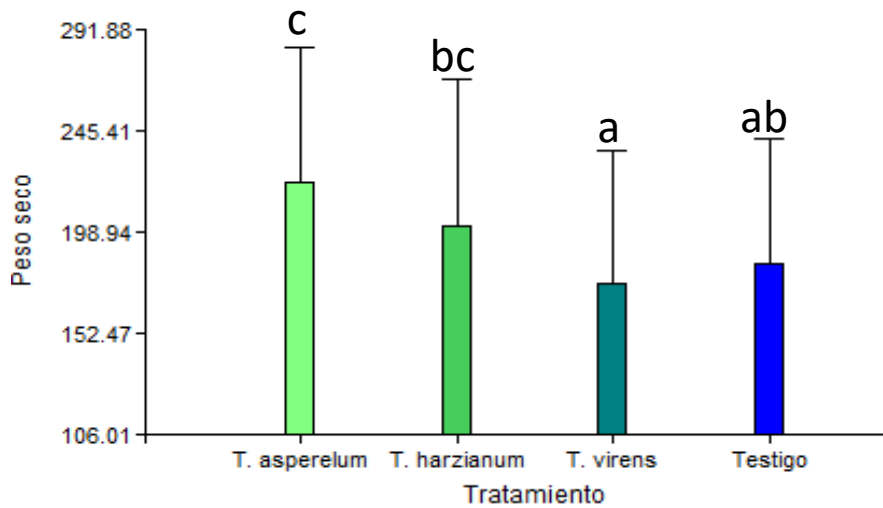
En la finca de Llano Grande se cultivó la variedad Alvara, variedad muy utilizada por los agricultores de la zona norte de Cartago, por su alta productividad, presenta el inconveniente del alto precio de la semilla, comparada con otras variedades, esta diferencia de precio puede oscilar entre un 75 a un 150%, a pesar de su alto precio, es muy demandada por los agricultores, ya que la oferta de variedades es muy limitada.

En la figura 5 se puede observar como *T. asperellum* es la que produce mayor cantidad de kilos de cebolla en peso frescos y los otros tres tratamientos estadísticamente son iguales, aunque el tratamiento con *T. harzianum* es superior en producción a los tratamientos *T. virens* y al testigo.



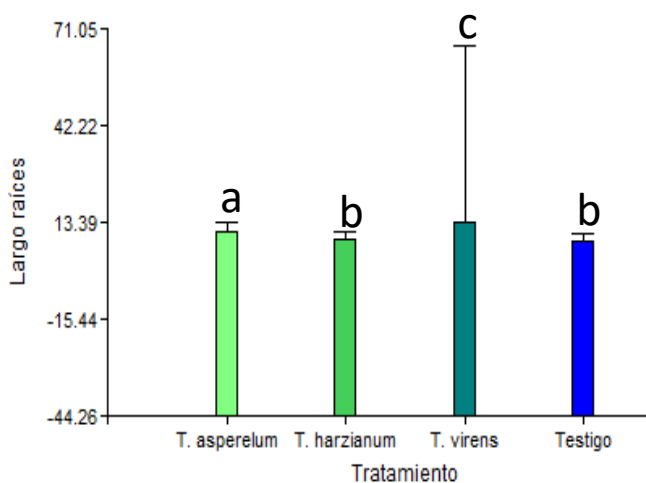
**Figura 5.** Promedio de los pesos frescos (gramos) en bulbos de cebolla de la variedad Alvara en Llano Grande de Cartago, según el análisis estadístico de ANOVA.

En la figura 6, se observa que el tratamiento *T. asperellum* es el que produce el mayor rendimiento en peso de bulbos secos, estadísticamente no hay diferencias entre *T. asperellum* y *T. harzianum*, mientras que los tratamientos *T. harzianum* y el testigo presentan rendimientos muy aparecidos, al igual que los tratamientos *T. virens* y el testigo, son iguales estadísticamente.



**Figura 6.** Promedio de los pesos secos (gramos) en bulbos de cebolla de la variedad Alvara en Llano Grande de Cartago, según el análisis estadístico de ANOVA.

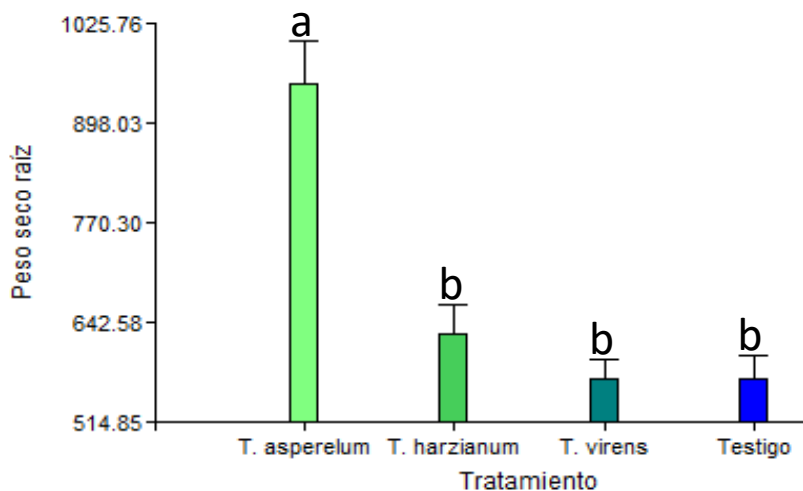
En la figura 7, se observa que el tratamiento *T. virens* es el que produjo la mayor longitud de las raíces y es estadísticamente diferente a los otros tratamientos, seguido de *T. asperellum*, mientras que los tratamientos *T. harzianum* y el testigo presentan promedios muy aparecidos estadísticamente.



**Figura 7.** Promedio de la longitud (centímetros) de raíces de cebolla de la variedad Alvara en Llano Grande de Cartago, según el análisis estadístico Kluskal-Wallis.



En la figura 8, se observa que el tratamiento *T. asperellum* el que produjo el mayor peso seco, mientras que los otros tratamientos son estadísticamente iguales.



**Figura 8.** Promedio de los pesos secos (gramos) de raíz de cebolla de la variedad Alvara en Llano Grande de Cartago, según el análisis estadístico Kluskal-Wallis.

## Discusión

Diversas especies de *Trichoderma sp* se han encontrado en el suelo y en la rizosfera de plantas y muchas especies de microorganismos benéficos se han encontrado colonizando las raíces de las plantas. En un análisis microbiológico de suelos se van a determinar muchas especies de microorganismos benéficos y patógenos, por lo que debe de existir un equilibrio en el suelo, para que los cultivo lleguen a la producción. Parte de ese equilibrio lo va a dar la presencia de materia orgánica, que es muy importante para el desarrollo y aporte de alimentos para los microorganismos.

Este hongo lo podemos encontrar en la rizosfera, tiene la capacidad de ingresar y colonizar las raíces, estableciendo simbiosis, que aumentan la resistencia de las plantas contra el ataque de patógenos, incrementando su actividad fotosintética, el rendimiento y el crecimiento.

Las especies de *Trichoderma* producen y regulan señales hormonales, como la producción de auxinas que promueven el crecimiento de las raíces. Las plantas como respuesta, depositan callosa y sintetizan polifenoles que inciden en el incremento de su respuesta sistémica a los patógenos. También, se ha encontrado que algunas especies de este

biocontrolador son capaces de vivir como endófitos de las plantas y provocar cambios que les permiten responder mejor a las enfermedades y al estrés abiótico (Mukherjee et al., 2012).

En los cuatro gráficos se observa como *T. asperellum* es la especie que presenta los mejores promedios (peso fresco, peso seco, longitud de raíz y peso de raíz), esto quiere decir que es una especie que va a incrementar la producción en kilos, con un mejor sistema radical, por lo que se va a favorecer un mejor desarrollo de la planta. Esta especie de *Trichoderma sp* se caracteriza estimular el crecimiento de la masa radicular y a la vez estimula la absorción de nutrientes.

Para la variedad de cebolla Alvara, la especie de *T. asperellum* fue la que obtuvo los mejores rendimientos (peso fresco, peso seco, longitud de raíz y peso de raíz), esto quiere decir que va a incrementarse la producción, con una mayor masa radical, compuesta por raíces secundarias o terciarias, que son las raíces que absorben los nutrientes y agua, por lo que se va a incrementar el desarrollo de la planta. Estas especies de *Trichoderma sp*, fueron aisladas de muestras de suelo de la zona norte de Cartago, son especies que pertenecen a la colección de hongos del laboratorio de Biocontrol del CIB.

Las especies de *Trichoderma sp* regulan vías metabólicas, como la producción de auxinas que promueven el crecimiento de las raíces. Las plantas como respuesta, depositan callosa y sintetizan polifenoles que inciden en el incremento de su respuesta sistémica a los patógenos. También, se ha encontrado que algunas especies de *Trichoderma sp* son capaces de vivir como endófitas de las plantas y provocar cambios que les permiten responder mejor a las enfermedades y al estrés abiótico (Mukherjee et al., 2012).

Además, se localiza en la rizosfera, donde se da una intensa comunicación entre las plantas y los microorganismos asociados a través del intercambio y percepción de señales. Como es bien conocido, *Trichoderma sp* presenta muchas características sobresalientes para ser utilizadas en la agricultura, desde su antagonismo contra hongos patógenos, la estimulación del crecimiento de las raíces, su rápido crecimiento y su adaptación a muchos sustratos.

Por lo que al ser utilizado *Trichoderma sp* en la agricultura de una forma correcta, se estaría disminuyendo la aplicación de agroquímicos y facilitando la absorción de nutrientes por la planta.

## Conclusiones

Se recomienda la aplicación de microorganismos benéficos en el cultivo de cebolla, para obtener cultivos más inocuos.

*Trichoderma sp* ha demostrado ser un biocontrolador que además de controlar patógenos en el cultivo de la cebolla, sirve como un estimulador de raíces, por lo que incrementa el largo y la masa radicular del cultivo.

Al estimular el crecimiento de las raíces, promueve un mayor llenado de los bulbos, por lo que se obtienen buenos rendimientos.

## Recomendaciones

La aplicación de microorganismos benéficos desde la etapa de almácigos, permitirá un mejor desarrollo del cultivo.

Se recomienda la aplicación de *Trichoderma asperellum* en el cultivo de la cebolla para el incremento de la producción

## Bibliografía

- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*. 17(8): 478-486
- Brenes M.J.; Chacón C., R.; Guillén W., A.; Hilje, L.; Rivera M.; W.; Zúñiga V.; C. 2013. Cultivo del ajo en Costa Rica. EUNED. ISBN 978-9968-31-958-4 100p.
- Dubay, R.K., Tripathi, V., Kumar D., P., Sing, H.B., Abhilash, P.C. 2016. Exploring rhizospheric interactions for agricultural sustainability: the need of integrative research on multi-trophic interactions. *Journal of Cleaner Production* 115: 362-365.
- Fonouni-Farde, C., Diet, A., Frugier, F. 2016. Root Development and Endosymbioses: DELLAsn Lead the Orchestra. *Trends in Plant Science* 21(11): 898-900.
- Garcia, K., Doidy, J., Zimmermann, S.D., Wipf, D., Courty, PE. 2016. Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends in Plant Science* 21(11):937-950.
- Granados, M. 2013. Problemas fitosanitarios de la cebolla en Costa Rica. Universidad de Costa Rica. Capitulo #7.
- M. Mukherjee et al., "Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control". *Indian J. Microbiol.*, vol. 52, pp. 522–529, 2012.
- Martínez, B., Infante D., Reyes Y. 2013. "Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos". *Rev. Protección Veg.*, vol. 28, pp. 1-11, 2013.
- Nadeem, S.M., Ahmad, M., Ahmad, Z., Z. Javaid, A., Ashraf, M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol Adv.* 32(2):429-48.
- Zhang, Y., Ruyter-Spira, C., Bouwmeester, H.J. 2015. Engineering the plant rhizosphere. *Current Opinion in Biotechnology* 32:136-142.

### **Objetivo Específico 3: Analizar in vitro y ex vitro la interacción entre microorganismos patógenos benéficos, la raíz de la planta y sus efectos en la regulación del crecimiento vegetal.**

Se presenta a continuación el correo de aceptación de la publicación del artículo científico que responde al objetivo 3, el cual se encuentra **en prensa**, así como el documento completo.

#### **Correo de aceptación**

**De:** em.ejpp.0.6a006c.758c33a0@editorialmanager.com

<em.ejpp.0.6a006c.758c33a0@editorialmanager.com> en nombre de European Journal of Plant Pathology <em@editorialmanager.com>

**Enviado:** Tuesday, March 17, 2020 1:34:28 PM

**Para:** William Eduardo Rivera Mendez <wirivera@itcr.ac.cr>

**Asunto:** EJPP-D-20-00181 - Submission Confirmation

Dear PHD Rivera-Méndez,

Thank you for submitting your manuscript,

"Effect of Setophoma terrestris, Sclerotium cepivorum, and Trichoderma spp. on onion (*Allium cepa*) root tissues and the final yield in the cropping", to European Journal of Plant Pathology

The submission id is: EJPP-D-20-00181

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the web site:

Your username is: wirivera@itcr.ac.cr

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/ejpp/>.

Springer offers authors the option of making their articles available with open access via our Open Choice programme. We advise you to familiarise yourself with the details of Springer Open Choice in advance, to be able to decide quickly should your paper be accepted for publication. Further information can be found at [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice).

With kind regards,

**Artículo completo:**

**Effect of *Trichoderma spp.*, *Sclerotium cepivorum*, and *Setophoma terrestris* on onion (*Allium cepa*) root tissues and the final yield in the cropping**

**William Rivera-Méndez<sup>a</sup>, Jaime Brenes- Madriz<sup>a</sup>, Luis Alvarado- Marchena<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup> Costa Rica Institute of Technology (ITCR). Calle 15, Avenida 14. Cartago, Costa Rica.

\* Corresponding author at Costa Rica Institute of Technology (ITCR). Calle 15, Avenida 14. Cartago, Costa Rica.

Email addresses: [wirivera@itcr.ac.cr](mailto:wirivera@itcr.ac.cr) (W. Rivera-Méndez), [jabrenes@itcr.ac.cr](mailto:jabrenes@itcr.ac.cr) (J. Brenes-Madriz), [lalvarado@itcr.ac.cr](mailto:lalvarado@itcr.ac.cr) (L. Alvarado-Marchena)

**ABSTRACT**

*Trichoderma* is a rhizosphere fungus widely used in agriculture due to the variety of biological control mechanisms that it can use. It can establish a direct relationship with the root cells, modifying the morphology and physiological processes, giving the plant a better defensive capacity against the attack of pathogens in the soil. In this research, *in vitro* plant promotion assay were made using *T. asperellum*, *T. harzianum*, and *T. virens* to test their effect on the development of onion seedlings from disinfected seeds. Roots of these plants were subjected to histological analysis using transmission electronic microscopy (TEM) to examine changes in cell structure. This analysis also included the pathogens *Sclerotium cepivorum* and *Setophoma terrestris*, major onion soilborne pathogens in Costa Rica. To verify the efficacy of the *Trichoderma* species used in the study, a field test was performed where the fresh and dry weight of onion bulbs and the mortality of the plants exposed to the mentioned pathogens were measured. Some histological modifications were observed in the root cells in the different treatments and were related to the effects reported for *Trichoderma*. It was shown that although *T. asperellum* did not stimulate *in vitro* root growth it can have an important effect in the field by reducing the number of infected plants and improving the final yield of the onion. On the contrary, species that have a root promoting effect do not necessarily improve yield.

**Keywords:** electron microscopy, histology, mortality, yield, biocontrol.

## INTRODUCTION

The massive application of synthetic products for the control of plant pests causes serious problems for human health and the environment (Debenest et al., 2010). The use of biological control agents as an alternative to conventional disease management practices is the main objective of agricultural policies worldwide (Tucci et al., 2010). Many of the biopesticides and biofertilizers that exist in the market have incorporated symbionts-beneficial fungi of the genus *Trichoderma* into their formulations (Woo et al., 2006).

*Trichoderma* is a genus widely known for its ability to control numerous foliar, root and fruit pathogens and even some invertebrates such as nematodes (Sharon et al., 2009). They also present the ability to promote plant growth by improving nutrient absorption (Harman et al., 2008), substantially increasing the efficiency of nitrogen use in crops (Harman 2000), improving photosynthetic efficiency and probably respiratory activities of plants (Shoresh et al, 2008); and providing resistance against biotic and abiotic stress (Shoresh et al, 2010). All these capacities are a consequence of their ability to reprogram the gene expression of the plant (Waller et al., 2005). For example, authors have reported that *Trichoderma* can activate Induced Systemic Resistance (ISR) (Sagarra et al., 2007), as well as routes related to the synthesis of auxins (Contreras et al., 2014), salicylic acid and jasmonic acid ( Segarra et al., 2007).

Despite the obvious importance of *Trichoderma* for agriculture, there is a great lack of knowledge about whether the plant's response to *Trichoderma* is directly influenced by its genotype (in terms of improving systemic resistance and promoting growth). To elucidate this important issue, this research aimed to study the interaction of *T. asperellum*, *T. harzianum* and *T. virens* on the cultivation of onion (*Allium cepa*), both *in vitro* and in field trials, through histological analysis. Besides, the effect of *Sclerotium* spp. and *Setophoma* spp. phytopathogenic fungi (necrotroph and biotroph, respectively) during plant development were studied. Plant-phytopathogenic *in vitro* tests were performed to evaluate the cytopathological effect, and plant-*Trichoderma*-phytopathogen field studies to evaluate the biocontroller effect of *Trichoderma*.

## MATERIAL AND METHODS

### *In vitro* plant promotion assay with *Trichoderma* spp.

To analyze the effect of *T. asperellum*, *T. viren* and *T. harzianum* over onion seedlings growth an *in vitro* assay were performed in 150mm x 15mm Petri dishes. Six seeds were surface-disinfected and placed to grown in Murashige and Skoog (MS) medium (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands), supplemented with 1% sucrose and 1.5% agar (pH 5.7) for 3 days. A conidia solution with  $1 \times 10^6$  conidia of each *Trichoderma* strain was applied at the opposite side of the plate with the seedlings. Seedlings without inoculation were used as a control condition. All plates were incubated under 40% humidity, 24°C, and a 16-h light/8-h dark photoperiod. After 5 days of inoculation, the root and stem length were measured in a triplicate experiment. The samples for the electronic microscopy analyses were taken in these dishes.

### *Histological analysis with Transmission Electronic Microscopy (TEM)*

Root segments of 0.3 mm in length, one centimeter from the stem base, were selected for this study. Roots inoculated with *T. asperellum*, *T. virens* and *T. harzianum*; as well as root without inoculating (control) were processed according to the standard procedure for biological samples described by Çağlayan et al., (2009), Elbeaino et al., (2009) and Castellano et al., (2007). The method consisted of performing a fixation during 2 days at 4°C in glutaraldehyde and paraformaldehyde at 2% dissolved in 0.1M phosphate buffer at a pH 7.2 for a later post-fixation at 2% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>). Afterward, the samples were dehydrated in gradual acetone dilutions and were polymerized in low viscosity Spurr® resin. The ultrafine cuts were dyed with 2% uranyl acetate and a saturated Sato's lead solution for 10 minutes, respectively. Finally, the samples were observed through TEM Jeol JEM 2010. The degree of differentiation of the vascular tissue from the root in the different treatments was evaluated. Also, roots were inoculated with the phytopathogenic fungi *Sclerotium* sp. and *Setophoma* sp. to evaluate, respectively, the necrotrophic and biotrophic cytopathic effect.

### *Field assay*

A field test was carried out in a growing season during the year 2019. The experimental farm was ubicated in the mountain region of Cartago province in Costa Rica, Central America, in a 2000 m altitude and 20° C as average temperature. The soil was silt loam with a pH of 5.9.



Seedlings of 50 days of growth were used for transplanting. Four treatments were established: Control, Ta, Th, and Tv. The control consisted of applications of chemical fungicides: carboxin and captan (Vitamax 400<sup>®</sup>, Arysta Lifesciences, Mexico) in the transplanting and tebuconazole (Folicur 25 EC<sup>®</sup>, Bayer CropScience, Costa Rica) after 30,45, 60, and 75 days of transplanting. Ta was *T. asperellum* in a conidia solution with  $1 \times 10^6$  conidia/mL, sprayed in the seedling roots in the transplanting and in the stems at ground level after 30, 45, 60 and 75 days of transplanting. Th was *T. harzianum* and Tv was *T. virens*, applied in the same concentration and identical ways of Ta. Each experimental unit was 0.1 x 0.1 m<sup>2</sup> with a density of 100 plants/m<sup>2</sup>. For each treatment, 3 repetitions were made with 10 plants in each repetition. Granular NPK fertilizer of 12-24-12 formula at 30 days, of 20-20-20 at 60 days, and of 12-11-17 at 90 days were used in all treatments. The final yield was measured after 4.5 months of transplanting, recording the fresh and dry weights. Incidence of *Setophoma terrestris* and *S. cepivorum* was evaluated under the same conditions in experimental units of 1,0m x 1,0m for every treatment. Initial inoculum *S. cepivorum* was measured following to Ulacio-osorio et al. (2006) and a for *S. terrestris* according to Netzer et al. (1985).

#### *Statistical analysis*

*In vitro* plant promotion assays and the incidence of *Sethophoma terrestris* and *Sclerotium cepivorum* in the field were statistically analyzed with One-way ANOVA and Fisher test ( $P < 0.05$ ) previous normality and homoscedasticity evaluation, using Minitab 18 Statistical Software (Minitab, Inc., State College, PA, USA). The field test was analyzed using the Kruskal Wallis test for non-normality samples and a Bonferroni comparison test (Alpha: 0,033) adapted by Minitab 18 Statistical Software (Minitab, Inc., State College, PA, USA).

## **RESULTS**

#### *In vitro plant promotion assay*

The *Trichoderma* effect on the growth of 3-days-old onion seedlings was evaluated *in vitro* tests (Table 2) with inoculations of three species. For root length, the statistical analysis showed differences between treatments. *T. harzianum* caused greater root elongation. *T. virens* had a similar effect than control and *T. asperellum*, conversely, caused root growth suppression. The difference in the growth between *T. harzianum* and *T. asperellum* was around 1,4cm in only 5 interaction days.

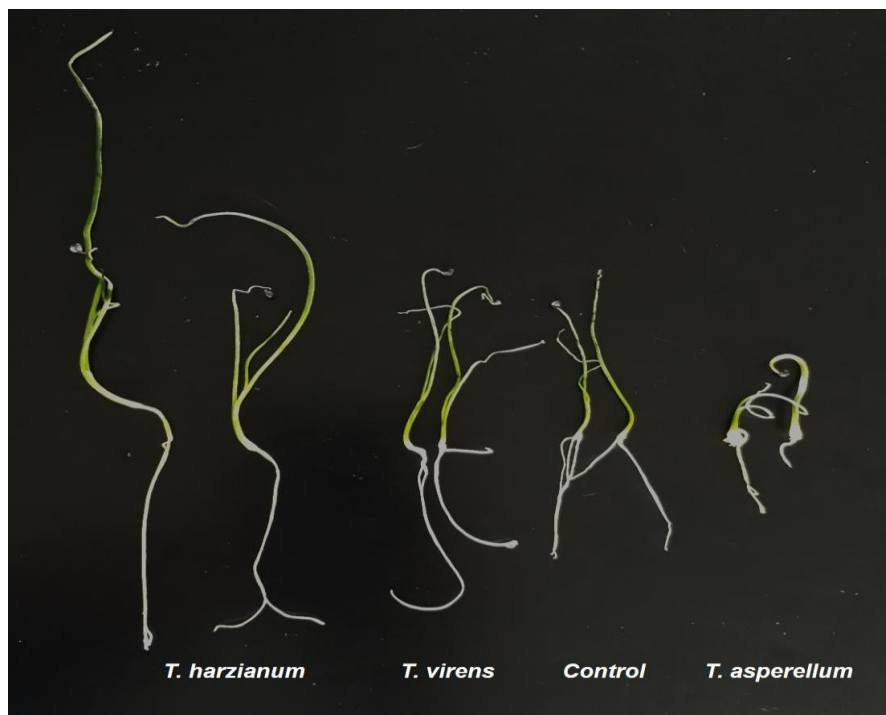
**Table 1**

Effect of three *Trichoderma* species on the growth of 3-day-old onion seedlings. Values were recorded in 8-day-old seedlings.

Treatment	Root length (cm)	Stem length (cm)
<i>T. harzianum</i>	2,9767±0,1050 a	5,1933±0,0321 a
<i>T. virens</i>	2,3367± 0,1026 b	3,3933±0,0404 b
Control	2,2067± 0,0833 b	3,3800±0,0900 b
<i>T. asperellum</i>	1,6067±0,0208 c	2,2767±0,1168 c

Values are means from three biological replicates ± standard deviations. Different letters indicate significant differences (Fisher test,  $P < 0.05$ ).

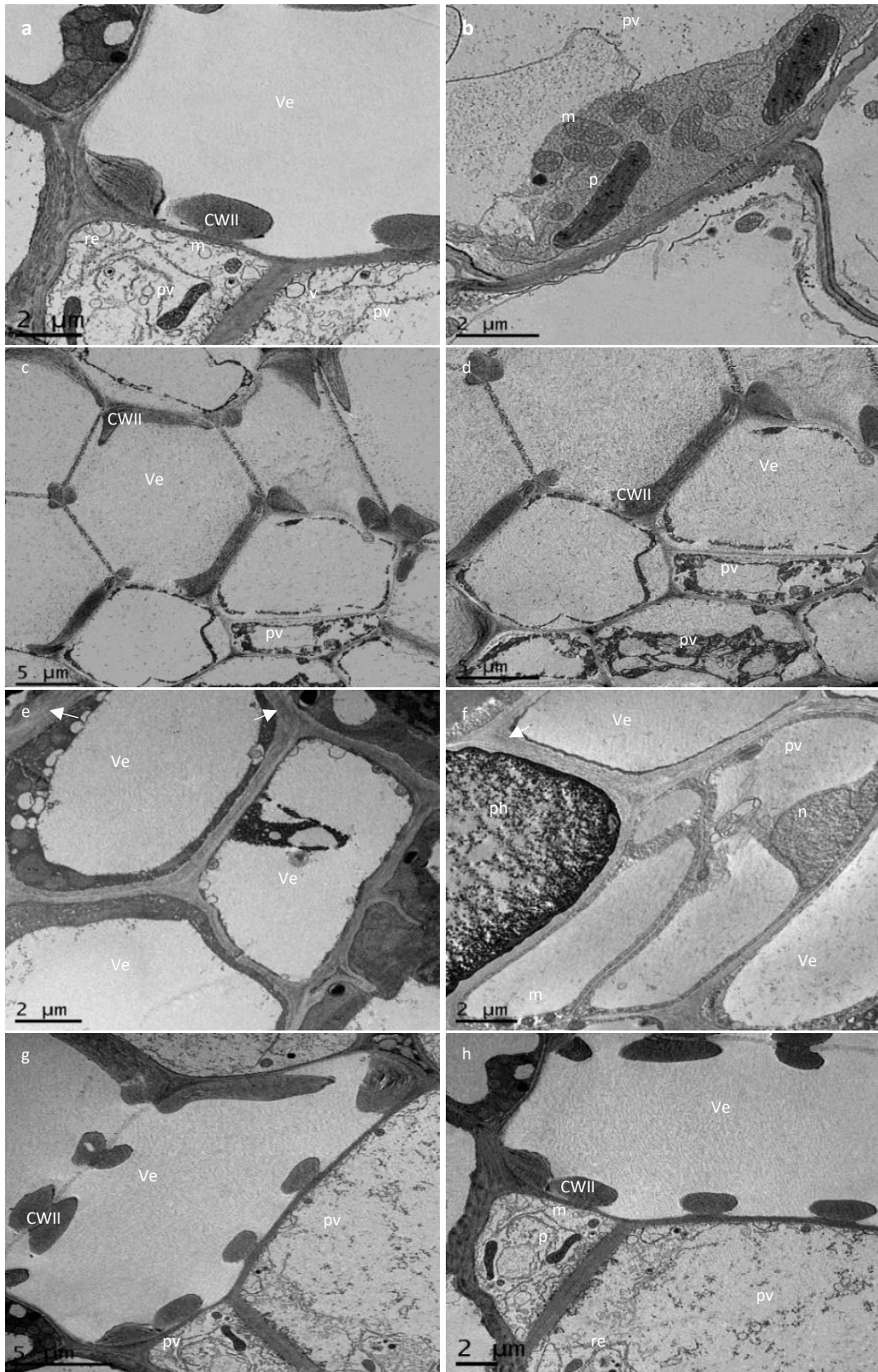
For stem length, also *T. harzianum* had the greater effect and *T. virens* had the same effect than the control. Again, *T. asperellum* caused suppression in the growth, reflected in the short stem and leaves. The difference between the stem lengths promoted by *T. harzianum* is evident and it is near 1.5 fold to control and 2.3 fold in comparison with the seedlings inoculated with *T. asperellum* (Figure 1).



**Figure 1.** Onion seedlings after 5 interaction days in Petri dishes with different *Trichoderma* species.

*Histological analysis with Transmission Electronic Microscopy (TEM)*

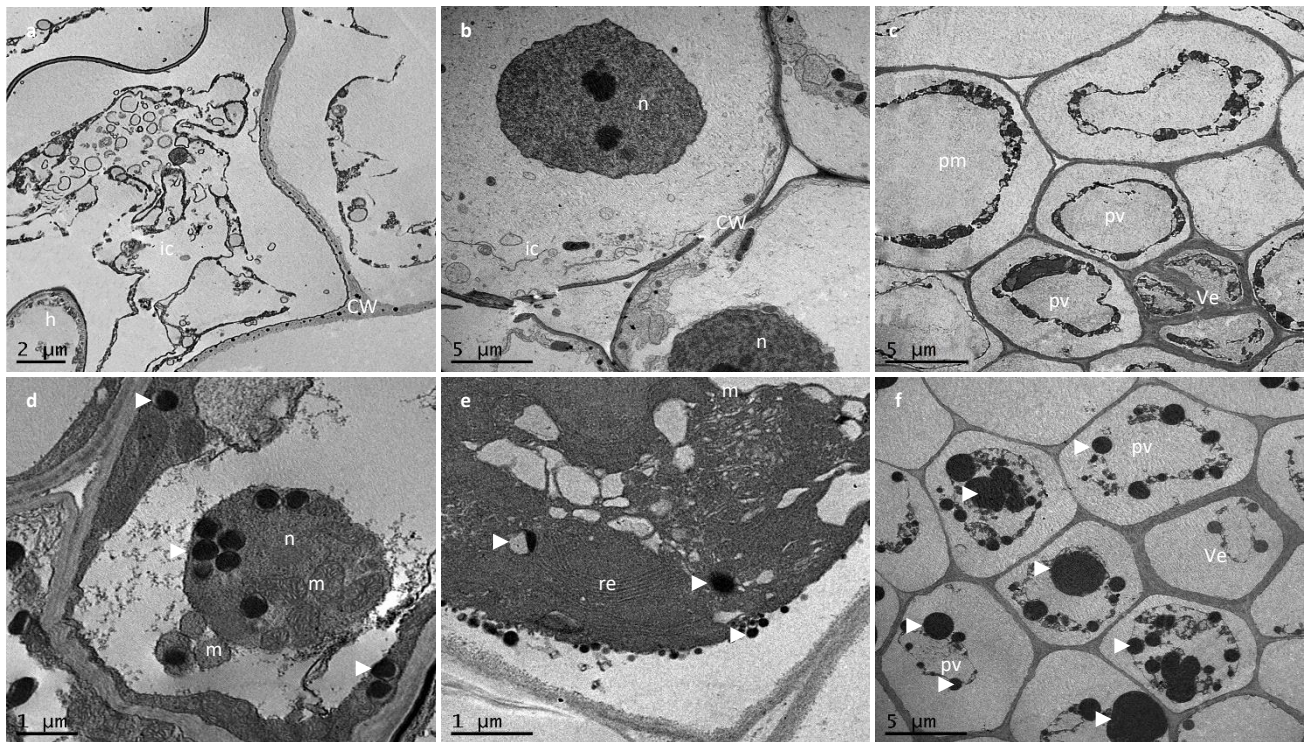
Ultrastructural studies showed notable differences at the vascular level between onion roots exposed to the different *Trichoderma* strains and control plants. In all cases, greater differentiation is observed in the elements of the root vessels inoculated with *Trichoderma*. Besides, parenchymal cells associated with the vessel element with high metabolic activity (with the presence of plastids, mitochondria and high concentrations of the endoplasmic reticulum) are observed. Finally, the vascular control tissue presents elements of the immature vessels, with secondary cell walls in formation and with organelles inside.



**Figure 2.** Root cross-section inoculated with *T. harzianum* (a and b), *T. virens* (c and d), control -without inoculating- (e and f) and *T. asperellum* (g and h). Ve: vessel element; pv:

parenchyma associated with the vessel element; ph: phloem; m: mitochondria; p: plastid; CWII: secondary cell wall deposits; Arrows: Secondary cell wall in formation.

Furthermore, the TEM analysis of samples onion root infected with and *S. cepivorum* and *S. terrestris*. showed marked differences in the mechanism of interaction with the host. *S. cepivorum* generates a proteolytic degradation of the cell wall and all intracellular components. Cell lysis is used by hyphae to absorb nutrients and continue the infection. Meanwhile, *S. terrestris* produces an alteration in the metabolism of the host to generate a greater production of assimilates - through cellular respiration-. It also alters the photosystem II of plastids, generated reactive oxygen species (ROS) and thereby programmed cell death (PCD).



**Figure 3.** Root cross-section inoculated with *S. cepivorum* (a, b, and c) and *S. terrestris* (d, e and f). h: hypha; CW: cell wall; ic: intracellular components; n: nucleus; Ve: vessel element; pm: parenchyma; pv: parenchyma associated with the vessel element; m: mitochondria; Arrows: plastoglobule; re: endoplasmic reticulum, Arrowhead: lipid bodies.

#### *Field assay*

Field assays were conducted to evaluate the effect of different *Trichoderma* species over the final yield expressed as fresh and dry weight thought sprayed conidia solutions (Table 2).

Cause the lack of normality in the data ( $p < 0,05$ ) was analyzed with the Kruskal Wallis test. Both weights, fresh and dry, show Ta increases the yield in comparison with other treatments and the Control.

**Table 2**

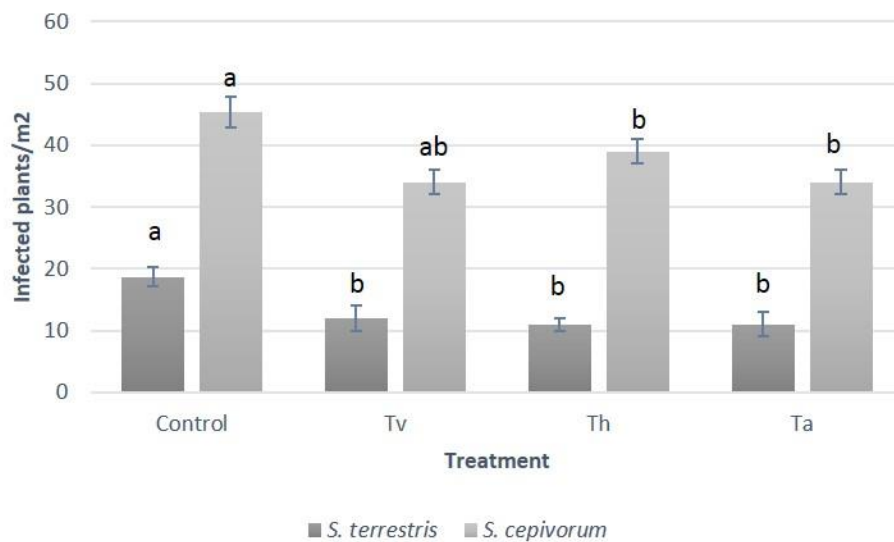
Effect of three *Trichoderma species* on the final fresh and dry weight of bulbs. Values were recorded after 5 months field test.

Treatment	Fresh weight (g)		Dry weight (g)	
	Median and Group	Z value	Median and Group	Z value
Ta	185 a	3,57	174,5 a	3,44
Th	144,5 b	-0,27	136 b	-0,22
Tv	144 b	-0,17	135b	-0,08
Control	144 b	-0,17	127 c	-3,12

Values are medians of three replicates. Z values according to the Kruskal test. Different letters mean different groupings for Kruskal Wallis and Bonferroni post hoc test. Bonferroni Z-value (2-sided): 2,128; Bonferroni individual Alpha: 0,033.

According to the median, three groups were founded in the analysis. First was Ta and there was a difference between Ta and the other two *Trichoderma* species. The second group was formed by Th and Tv. Also, this second group has a difference with the third, the control condition. This test exhibited the ability of *T. asperellum* to affect the bulb weight and cause an increase in the final yield, in contrast with the showed in the *in vitro* plant promotion test.

The effect of *Trichoderma* spp. biocontroller was determined in the analysis of infected plants by *S. cepivorum* and *S. terrestris* in field assays. In the case of *S. terrestris*, all three *Trichoderma* species showed a significant reduction of infected plants in comparison to the Control ( $p < 0,05$ ), but there was no difference between the effect of species. The trials with *S. cepivorum* had similar behavior, where *Trichoderma* species decreased the number of infected plants.



**Figure 4.** Infected plants by two different onion pathogens in field assays. *S. terrestris* (biotroph) and *S. cepivorum* (necrotrophic). All values are the means of three replicates. Values followed by different letters are significantly different according to the Fisher test ( $P < 0.05$ )

## DISCUSSION

*Trichoderma* is a fungus widely used in the biological protection of crops. It can establish relationships with host plants and modify some of its physiological processes and the structure of organs such as the root (Contreras-Cornejo et al., 2015). The modifications caused depend on the metabolic pathways that are activated in the plants during their relationship with a species of *Trichoderma* through a complex system of cross-communication (Contreras-Cornejo et al., 2013).

The mechanism that allows *Trichoderma* to remain within the root system of a plant as an avirulent symbiote is not yet totally clear (Tucci et al., 2011). However, it's known that some strains of *Trichoderma* promote growth and development and therefore an increase in performance (Lorito et al., 2010).

Root growth regulation trials showed that *T. harzianum* effectively caused an elongation of the onion's root and stem. Cai et al., (2013) observed the same in experiments carried out with tomato and attributed the increase in lateral root formation to the action of the harzianolide. Other research has shown similar results (Harman et al., 2004; Bal and Altintas, 2008). In cases where *Trichoderma* stimulate the root, it has been proven that there is a direct stimulation of *Trichoderma* in root development through the production of hormone-like compounds or the generation of direct effects on plant hormones (Bae et al., 2009), which favor a greater availability of phosphorus and micronutrients, as well as a better water absorption (Gravel et al., 2007).

On the contrary, *T. asperellum* had a negative effect, and compared to the control caused a decrease in the root. The regulation of the biological control mechanisms deployed by *Trichoderma* is mediated by the activation of different metabolic pathways, among which the salicylic acid, ethylene and jasmonate route stand out (Martínez-Medina et al., 2017; Muday et al., 2012; Segarra et al., 2007). In the balance that a plant must perform between defense and growth, the synthesis of ethylene and indoleacetic acid (AIA) is particularly important, as well as the action of the ACC deaminase (ACCD) produced by *Trichoderma* (Hermosa et al., 2012). Different isolates of *Trichoderma*, may or may not cause root or plant growth and within the same species, not all isolates can favor this growth (Steward and Hill, 2014).

The hormonal and nutritional variation affects the root architecture (Hermosa et al., 2013), generating an increase in biomass production, lateral root formation and greater differentiation of radical hairs (Contreras et al., 2009). Also, studies by Contreras et al., (2014) in *Arabidopsis* exposed to saline stress (a condition that blocks the signaling of auxins) and inoculated with *T. virens* and *T. atroviride*, suggest that *Trichoderma* improves the levels of indole-3-acetic acid (IAA); allowing to overcome saline stress, improve root architecture, and increase the osmoprotective state of plants.

This is related to histological analyzes, where it is observed how vascular tissues of onion root exposed to different strains of *Trichoderma* (Figure 2 a y b: *T. harzianum*; c y d: *T. virens*; e y f: *T. asperellum*) have greater differentiation of vascular tissue, specifically xylem tissue, compared to control tissue. Besides, metabolically active parenchymal cells are



observed, which help transport at a short distance, which facilitates the loading and unloading of the vessel element (Lomax et al., 2010).

The development of new vascular tissues allows the regeneration of the plant and its adaptation to environmental changes (Aloni et al., 2001). Despite the structural and developmental complexity of vascular tissues, there is evidence that the differentiation of the vessel elements is induced by an important hormonal signal of the IAA, produced mainly by young leaves (Aloni et al., 2003). Due all the treatments were in the same conditions, and the only difference is the presence of a *Trichoderma* strain, it is suggested that the difference in the cellular architecture of onion roots is due to a direct *Trichoderma* stimulus.

It is important to note that this notable difference in cellular architecture does not necessarily have a direct effect on root length. This was demonstrated by Tucci et al., (2011) who studied the effect of *T. atroviride* and *T. harzianum* on different genotypes of *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*. Although significant anatomical differences were found concerning plants not inoculated with *Trichoderma*, in most cases it did not affect root length.

Moreover, it has been reported that during infection of the phytopathogenic fungus *Sclerotium* sp., the hyphae secrete oxalic acid -like a corrosive substance- and enzymes that degrade cellular components -like cellulose-(Ghaffar, 1976; Punja et al., 1996). Oxalic acid combines with intracellular calcium and destabilizes the pectic compounds in the cell wall; this decreases the pH and, therefore, promotes the activity of enzymes that degrade this organelle (Deacon, 2006).

The joint work of oxalic acid and enzymes that degrade the cell wall resulting in the tissue maceration. The nutrients released in this process are absorbed by the hyphae of *S. cepivorum* (Deacon, 2006). This is consistent with the TEM studies, where the integral degradation of cells that has been penetrated by an *S. cepivorum* hypha is observed (Figure 3a), as well as the rupture of the cell wall resulting from destabilization caused by oxalic acid and specialized enzymes (Figure 3b). Furthermore, immature vascular tissue observed with little or no functionality (Figure 3c), which agrees with Masum et al., (2017) who reported that tissue maceration interrupts the transport of water and nutrients in the plant, causing wilting, yellowing and necrosis.

Regarding the infection caused by *S. terrestris*, Schwartz and Mohan (2007) have reported that infected plants have a decrease in the absorption of water and nutrients, which leads to wilting and necrosis. Also, Berger et al., (2004) reported that plants increased demand for assimilated because of *S. terrestris*. manipulates the host metabolism in favor of their nutritional requirements.

Nutritional manipulation of the host level is generated by a reduction in photosynthetic rate and increased respiration activity (Roitsch et al., 2003). Studies by Yamane et al., 2000 indicate that *S. cepivorum* affects the irreversible closure of some reaction centers of photosystem II -PSII- in plants, which generates overexcitation and the formation of reactive oxygen species (ROS) and, with it, the programmed cell death (PCD) (Sayago et al., 2019). This is consistent with the TEM studies since an evident alteration in the metabolism of mitochondria was observed, which were swollen due to the high rates of cellular respiration (Figure 3d), as well as the initial degradation of plastids, which form the characteristic plastoglobules (Figure 3 d & e). Also, a high vesiculation rate was observed, which is required for the transport of assimilates (Figure 3 e). On the other hand, in the most affected tissues, a reduction of the cytoplasm was observed as well as large lipid bodies, which agglomerate all dead intracellular compartments (characteristic cytology of PCD).

The field test established that the three *Trichoderma* species were able to increase onion yield, but with significant differences between them. *T. asperellum*, again differed from other treatments, by increasing the fresh and dry weight of the bulbs. This behavior had been previously observed by Pascale et al., in the production of grapes in systems infected with powdery mildew (2017). In the cultivation of onions specifically, Ortega-García et al., (2015), observed increases in the biomass of the bulbs when the plants were inoculated with three different isolates of *T. asperellum*. Recently Rivera Méndez et al., (2020) showed that *T. asperellum*, although *in vitro* and greenhouse tests did not cause an increase in root and stem elongation, in field tests it was able to increase the crop yield, through the induction of systemic responses and mycoparasitism resistance against root necrotrophic pathogens. The phytostimulation obtained in the interactions of plants with *Trichoderma* is not only due to the development of the root architecture but is caused by a series of stimulated direct and indirect effects on the plants, which is reflected in the increase in yields (Fiorentino et al., 2018).

The effects of an endophytic microorganism such as *Trichoderma* on the plant, depending on the type of interaction established through molecular dialogue, induced or subregulated metabolic pathways and biotic and abiotic factors (Gúzman-Gúzman et al., 2018; Mendoza-Mendoza et al., 2018). Although the endophytic capacity of a microorganism in a plant requires histological changes in the roots, these do not always lead to a promotion of root growth. Similarly, the increase in fresh and dry weights of a crop is not always associated with the increased root or aerial growth, and species of organisms that promote growth may not necessarily influence final yields.

To verify the antagonism capabilities of the three different *Trichoderma* isolates used in this study, the number of infected plants by two different pathogens were recorded in the field assays. *S. terrestris* and *S. cepivorum* are two strong pathogens in onion crops (Orio et al., 2016; Jung et al., 2010), with a different parasitic lifestyle as biotroph or necrotroph, respectively.

Against both pathogens, and regardless of the *Trichoderma* species used, there was a reduction in the number of diseased plants with significant differences between *Trichoderma*-based treatments and control. Other authors have reported similar effects. *T. asperellum* was recently evaluated in the control of *S. cepivorum*, where its ability to combat this fungus was demonstrated and manages to reduce crop losses (Rivera-Méndez et al., 2020). *T. harzianum* effectively controlled *S. cepivorum* in field trials (Coşkuntuna and Özer, 2008; Lane and Bowen, 2005). For its part, *T. virens* has been reported as an effective mycoparasite fungus against *S. cepivorum in vivo*, greenhouse and field tests (Shalabi et al., 2013). Also, Clarkson et al., (2002) verified the effect of an isolate of *T. virens* in field tests in the U.K, where the number of infected plants was lower compared to the other treatments. Besides, Al-Ani (2018) and Rivera-Méndez et al., (2018) obtained high parasitism values of *T. virens* in dual culture versus *S. terrestris*.

In this study, given that the three *Trichoderma* species reduced the number of infected plants and improved yield, it is demonstrated, in the case of *T. asperellum*, that despite harming root growth *in vitro* test, other biocontrol mechanisms are those involved in the relationship with pathogens *S. terrestris* and *S. cepivorum*, possibly associated with the processes of mycoparasitism and induction of defenses in the plant. Both, *Trichoderma* spp., *S. terrestris*, and *S. cepivorum*, about onion, they induce changes in the morphology of the cells and affect

the growth of the plant, but also, the interaction between them is defined by the various biocontrol mechanisms that *Trichoderma* can use, which constitutes a fundamental difference between the species of this endophytic genus.

## **5. Conclusions and recommendations**

*Trichoderma* is a fungus capable of establishing biochemical relationships with plants. This microorganism, widely used in biological control, can generate physiological and anatomical variations that help the normal development of the plant, in crop yield, or functioning as a defense mechanism for the host against pathogens.

Not all *Trichoderma* species have the same morpho-physiological effect in a given crop. It has been reported that *Trichoderma* can mediate the activation of different metabolic pathways in plants, including routes that stimulate the synthesis of hormones -auxins, salicylic acid, ethylene, and jasmonate-. In this sense, each species of *Trichoderma* interacts specifically with its host, generating certain physiological and anatomical effects; which will also depend on the metabolic state that the host plant presents at a given time, which also depends on its interaction with the biotic and abiotic factors that surround it.

On the other hand, in the present study, the behavior of an infection by a phytopathogenic necrotrophic fungus (*S. cepivorum*) and another biotroph (*S. terrestris*) was evidenced. This analysis is of special relevance for future studies; as they could explain at the cytological level, how *Trichoderma* mitigates the infection caused by these phytopathogens (promising results shown at the field level in this study).

Additionally, together with the triple plant/fungus interaction studies (phytopathogen and biocontroller) that the authors propose at the histological level, the study of the expression of key genes involved in the response of the plant to an attack is also proposed.

## **Acknowledgments**

This work was supported by the Costa Rican Government [Project FITTACORI F03-18 ] and the Costa Rica Institute of Technology (ITCR) [Project VIE 1510098 ].

## References

- Al-Ani, L. K. T. (2018). *Trichoderma* from Extreme Environments: physiology, diversity, and antagonistic activity. In *Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications* (pp. 389-403). Springer, Singapore.
- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M., & Ullrich, C. (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta*, *216*, 841-853. doi: 10.1007/s00425-002-0937-8
- Aloni, R. (2001). Foliar and axial aspects of vascular differentiation - hypotheses and evidence. *Journal of Plant Growth Regulation*, *20*, 22-34. doi: 10.1007/s003440010001
- Bae, H., Sicher, R., Kim, M., Kim, S., Strem, M., Melnick, R., & Bailey, B. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, *60*, 3279–3295. doi: 10.1093/jxb/erp165
- Bal, U., & Altintas, S. (2008). Effects of *Trichoderma harzianum* on lettuce in protected cultivation. *Journal of Central European Agriculture*, *9*(1), 63-70.
- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W., & Roitsch, T. (2004). Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum*, *122*, 419-428. doi: 10.1111/j.1399-3054.2004.00433.x
- Cai, F., Yu, G., Wang, P., Wei, Z., Fu, L., Shen, Q., & Chen, W. (2013). Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant physiology and biochemistry*, *73*, 106-113.
- Clarkson, J. P., Payne, T., Mead, A., & Whipps, J. M. (2002). Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant Pathology*, *51*(6), 735-745.
- Contreras, H., Macías, L., Alfaro, R., & López, J. (2014). *Trichoderma* spp. Improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na<sup>+</sup> elimination through root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *27*(6), 503-514. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0265-R
- Contreras, H., Macías, L., Cortés, C., & López, J. (2009). *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *149*, 1579-1592. doi: 10.1104/pp.108.130369
- Contreras-Cornejo, H. A., López-Bucio, J. S., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, Á. A., & López-Bucio, J. (2015). Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root-

system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(6), 701-710.

Contreras-Cornejo, H. A., Ortiz-Castro, R., López-Bucio, J., & Mukherjee, P. K. (2013). Promotion of plant growth and the induction of systemic defense by *Trichoderma*: physiology, genetics, and gene expression. *Trichoderma: Biology and Applications*, 175, 96.

Coşkuntuna, A., & Özer, N. (2008). Biological control of onion basal rot disease using *Trichoderma harzianum* and induction of antifungal compounds in onion set following seed treatment. *Crop protection*, 27(3-5), 330-336.

Deacon, J.W. (2006). *Fungal Biology*. 4th edition. Oxford, UK: Blackwell Publishing.

Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M. and Pinelli, E. (2010). Effects of pesticides on freshwater diatoms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 203, 87–103.

Fiorentino, N., Ventorino, V., Woo, S. L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., ... & Roupheal, Y. (2018). *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield and nutritional quality of leafy vegetables. *Frontiers in plant science*, 9, 743.

Ghaffar, A. (1976). Inhibition of fungi as affected by oxalic acid production by *Sclerotium delphinii*. *Pakistan Journal of Botany*, 8, 69-73.

Gravel, V., Antoun, H., & Tweddell, R. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 1968–1977. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.02.015

Guzmán-Guzmán, P., Porrás-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2018). *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology*, 109(1), 6-16.

Harman, G.E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84, 377–93.

Harman, G.E., Bjorkman, T., Ondik, K., & Shores, M. (2008). Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. *Outlooks on Pest Management*, 19, 24–29.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43.

Hermosa, R., Rubio, M., Cardoza, R., Nicolás, C., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16, 69-80. doi: 10.2436/20.1501.01.181

- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, *158*(1), 17-25.
- Jung, J. H., Kim, S. W., Min, J. S., Kim, Y. J., Lamsal, K., Kim, K. S., & Lee, Y. S. (2010). The effect of nano-silver liquid against the white-rot of the green onion caused by *Sclerotium cepivorum*. *Mycobiology*, *38*(1), 39-45.
- Kogel, K.H., Achatz, B., Baltruschat, H., Becker, K., & Deshmukh, S. (2003). Systemic activation of the antioxidant system in monocots is a significant feature of enhanced disease resistance and tolerance to abiotic stresses mediated by root endophytes. *Free Radical Research*, *37*, 3–4.
- Lane, S. D., & Bowen, N. J. (2005). Revisiting the use of Iprodione and *Trichoderma* in the integrated management of onion white rot. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *38*(2), 133-138.
- Lomax, T.L., Munday, G.K., & Rubery, P.H. (2010). Auxin transport. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action. The induction of vascular tissues by auxin*. (pp. 485-506). Springer. doi: 10.1007/978-1-4020-2686-7.
- Lorito, M., Woo, S., Harman, G., & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from ‘Omics’ to the field. *Annual Review Phytopathology*, *48*, 395–417. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114314.
- Martínez-Medina, A., Appels, F. V., & van Wees, S. C. (2017). Impact of salicylic acid-and jasmonic acid-regulated defenses on root colonization by *Trichoderma harzianum* T-78. *Plant signaling & behavior*, *12*(8), e1345404.
- Masum, K., Billal, M., & Hasan, M. (2017). Pathogenicity of *Sclerotium Rolfsii* on Different Host, and Its over Wintering Survival; A Mini-Review. *International Journal of Advances in Agriculture Sciences*, *7*(2), 1-6.
- Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A., & Mukherjee, P. K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, *32*(2), 62-85.
- Muday, G. K., Rahman, A., & Binder, B. M. (2012). Auxin and ethylene: collaborators or competitors?. *Trends in plant science*, *17*(4), 181-195.
- Netzer, D., Rabinowitch, H. D., & Weintal, C. H. (1985). Greenhouse technique to evaluate onion resistance to pink root. *Euphytica*, *34*(2), 385-391.
- Orio, A. G. A., Brücher, E., & Ducasse, D. A. (2016). A strain of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* shows a specific antagonistic activity against the soil-borne pathogen of onion *Setophoma terrestris*. *European journal of plant pathology*, *144*(1), 217-223.

Ortega-García, J. G., Montes-Belmont, R., Rodríguez-Monroy, M., Ramírez-Trujillo, J. A., Suárez-Rodríguez, R., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2015). Effect of *Trichoderma asperellum* applications and mineral fertilization on growth promotion and the content of phenolic compounds and flavonoids in onions. *Scientia Horticulturae*, *195*, 8-16.

Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., ... & Lorito, M. (2017). *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop protection*, *92*, 176-181.

Punja, Z., & Damiani, A. (1996). Comparative growth, morphology, and physiology of three *Sclerotium* species. *Mycologia*, *88*(47), 694-706.

Rivera-Mendez, W., Fuentes-Alfaro, R., Courrau-López, K., Aguilar-Ulloa, W., Zúñiga-Vega, C., & Brenes-Madriz, J. (2019). Biological control of *Setophoma terrestris* isolated from onion rhizosphere in Costa Rica. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *52*(7-8), 813-824.

Rivera-Méndez, W., Obregón, M., Morán-Diez, M. E., Hermosa, R., & Monte, E. (2020). *Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions. *Biological Control*, *141*, 104145.

Roitsch, T., Balibrea, M., Hofmann, M., Proels, R., & Sinha, A. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, *54*, 513–524. doi: 10.1093/jxb/erg050

Sayago, P., Juncosa, F., Albarracín, A., Luna, D., Molina, G., Lafi, J., & Ducasse, D. (2019). *Bacillus subtilis* ALBA01 can mitigate onion pink root symptoms caused by *Setophoma terrestris*. *bioRxiv*. doi: 10.1101/601633

Schwartz, H., & Mohan, S. (2007). Compendium of onion and garlic diseases and pests. *APS Press St Paul MN*, *1008*, 127. doi: 10.1094/9780890545003.002

Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M. A., Oliveira, E., & Trillas, I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*, *7*(21), 3943-3952.

Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M.A., Oliveira, E. & Trillas, I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*, *7*, 3943 - 3952.

Shalaby, M. E., Ghoniem, K. E., & El-Diehi, M. A. (2013). Biological and fungicidal antagonism of *Sclerotium cepivorum* for controlling onion white rot disease. *Annals of microbiology*, *63*(4), 1579-1589.



Sharon, E., Chet, I., & Spiegel, Y. (2009). Improved attachment and parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* in vitro. *European Journal of Plant Pathology*, 123, 291–99.

Shoresh, M., & Harman, G.E. (2008). The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiology*, 147, 2147–63.

Shoresh, M., Harman, GE y Mastouri, F. (2010). Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 21-43.

Stewart, A., & Hill, R. (2014). Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 415-428). Elsevier.

Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 431-354. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x

Ulacio-Osorio, D., Zavaleta-Mejía, E., Martínez-Garza, A., & Pedroza-Sandoval, A. (2006). Strategies for management of *Sclerotium cepivorum* Berk. in garlic. *Journal of Plant Pathology*, 253-261.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., & Becker, K. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *PNAS*, 102, 13386-91.

Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M. and Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96, 181–185.

### **Agradecimientos generales del proyecto**

Se agradece al Programa FITTACORI, a las Agencias del MAG de Tierra Blanca y Llano Grande y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión el financiamiento de esta investigación.