

Efecto de los metabolitos producidos por *Trichoderma atroviride* sobre la germinación de semillas de jitomate, bajo estrés térmico

Effect of the metabolites produced by *Trichoderma atroviride* on the germination of tomato seeds under heat stress

Lúthien Sofía López Garnica¹, María Alejandra Osornio González¹, Francisco Vargas Gasca¹, Vianey Olmedo Monfil^{1*}

¹ Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, CP. 36050, Guanajuato, Gto., México.
vg.olmedo@ugto.mx; f.vargasgasca@ugto.mx

*Autor de correspondencia

Resumen

El cambio climático representa uno de los mayores desafíos actuales. Este fenómeno ha alterado el equilibrio natural, generando escasez de recursos y aumento en la temperatura, lo que amenaza directamente la producción agrícola. Para enfrentar esto, se han explorado alternativas como el uso de agentes microbiológicos, destacando el papel del hongo *Trichoderma atroviride*. Este hongo, presente en diversos suelos, tiene la capacidad de liberar metabolitos, como fitohormonas, esenciales para los procesos fisiológicos de las plantas. En este proyecto, se evaluó el efecto de los metabolitos producidos por la cepa silvestre de *T. atroviride* sobre la germinación de semillas de jitomate, bajo estrés térmico, sembradas junto al hongo y en tratamientos previos con sus compuestos secretados. Determinamos un impacto positivo en la germinación de las semillas tratadas con sobrenadantes de *T. atroviride*, bajo condiciones de estrés térmico, lo que representa una estrategia biotecnológica para proteger cultivos de las condiciones térmicas cambiantes y fortalecer al sector agroalimentario.

Palabras clave: cambio climático; estrés térmico; germinación; metabolitos; fitohormonas; *Trichoderma*.

Introducción y Antecedentes

El cambio climático se ha convertido en un desafío constante. Sin duda alguna, la huella ecológica que ejercemos en el espacio natural es significativa, como resultado del desarrollo de las industrias, globalización e incremento de la población (Reynosa, 2015). Hemos generado una alteración acelerada en el equilibrio de la naturaleza, viéndose afectados factores ambientales, como la temperatura. De acuerdo con la Secretaría del Agua y Medio Ambiente (SAMA), desde el año 2020 hasta el 2045, se prevé que el Estado de Guanajuato siga teniendo un incremento de 2°C en el promedio de la temperatura anual, ocasionando un impacto negativo en las especies vegetales, que dependen de estas variables para poder establecerse y mantenerse viables (Rajjou *et al.*, 2012).

El incremento de la temperatura afecta la fisiología de las plantas en muchos niveles, en particular en el proceso de germinación, donde el embrión tiene que salir del estado de dormancia, sincronizando señales entre sus tejidos, para la degradación enzimática del endospermo (reserva de nutrientes para el embrión) y poder emerger de la cubierta de la semilla (Azcón-Bieto & Talón, 2013). Durante este estadio, intervienen diversas moléculas clasificadas como fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas, entre otras), las cuales regulan los procesos fisiológicos en la planta (Molina *et al.*, 2020). La producción de semillas y su germinación eficiente representan retos importantes en la agricultura, para poder tener cultivos robustos con buena productividad (Rajjou *et al.*, 2012).

En los últimos años, se han implementado prácticas agrícolas que hacen uso de microorganismos como bacterias y hongos, que suelen habitar en la rizósfera y que funcionan como agentes bioestimulantes para las plantas. También, se pueden aprovechar los metabolitos que estos agentes producen para promover el crecimiento y desarrollo vegetal, además de controlar eficazmente diversos patógenos y plagas (Vukelic *et al.*, 2024). En este contexto, destacan los hongos filamentosos del género *Trichoderma*, que son reconocidos por ser simbiontes benéficos de plantas. Estos hongos se encuentran en casi todos los tipos de suelo, tanto naturales como agrícolas. Tienen la capacidad de colonizar las raíces, pudiendo establecerse de manera endófito (Guzmán *et al.*, 2019). Particularmente, la especie *Trichoderma atroviride*, tiene la capacidad de producir múltiples metabolitos con capacidad antimicrobiana y lítica (Molina *et al.*, 2020), que actúan como factores clave para limitar el crecimiento de fitopatógenos que puedan atacar a las plantas, o que pueden funcionar como elementos de activación de la propia respuesta de defensa vegetal. Adicionalmente, se ha reportado que este microorganismo es capaz de sintetizar algunas fitohormonas, en particular citocininas (CKs) (Molina *et al.*, 2020). De acuerdo con las investigaciones realizadas por Molina y colaboradores (2020), *T. atroviride* produce preferentemente la CK conocida como cis-zeatina, que libera al exterior. Como se mencionó, las fitohormonas son elementos clave que coordinan múltiples procesos fisiológicos en las plantas, en el caso de las CKs se les relaciona con respuestas a condiciones de estrés como las altas temperaturas (Liu *et al.*, 2020). Cuando se cultiva el hongo en medio líquido, se facilita la recuperación de estas fitohormonas y de otros metabolitos producidos simultáneamente.

Es posible que los metabolitos que libera *T. atroviride*, puedan tener un impacto positivo sobre la fisiología de las plantas, en particular en condiciones abióticas adversas. En el presente trabajo, evaluamos el efecto de esos metabolitos sobre la germinación de semillas de jitomate, expuestas a estrés por calor, siendo uno de los principales factores alterados por el cambio climático.

Materiales y métodos

Para obtener los metabolitos producidos por *T. atroviride*, se inocularon 1×10^6 conidias del hongo en medio líquido MS 1x. Los cultivos se incubaron durante 72 h a 28 °C con agitación a 220 rpm. Pasado este tiempo, bajo condiciones de esterilidad, se filtraron para eliminar por completo el micelio y obtener los sobrenadantes (SN), conteniendo los metabolitos.

Se usaron semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum*, variedad Río Grande) que fueron lavadas con hipoclorito de sodio al 1%, durante 10 minutos, y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril por 5 minutos y se vernalizaron, sumergidas en el agua durante 24 h a 4 °C. Se realizaron dos tratamientos para las semillas de jitomate; la exposición directa al hongo en crecimiento y la inmersión de las semillas en SN del cultivo de *T. atroviride*.

Para el primer tratamiento, se prepararon placas Petri con medio MS 1X, (4.33 g/L marca PhytoTec y 60 g/L de sacarosa, este medio de cultivo fue ajustado a pH 5.7), donde se inocularon 1×10^5 conidias de *T. atroviride* en el centro, se colocaron 40 semillas de jitomate en el borde de la placa y se mantuvieron a temperatura ambiente. Se realizó el seguimiento de la germinación hasta 120 h, justo antes de que hubiera contacto directo entre el micelio y las semillas. Se realizaron 5 réplicas, para un total de 200 semillas.

En el segundo tratamiento, se evaluó la germinación de un grupo de semillas a temperatura ambiente y otro grupo de semillas que estuvieron bajo un episodio de estrés por calor. Para ello, posterior a la vernalización, las semillas fueron sumergidas en SN durante tres horas, y fueron colocadas en placas de Petri conteniendo un papel filtro, humedecido con agua destilada estéril para conservar la humedad. Las placas con las semillas fueron incubadas a temperatura ambiente. Para la condición de estrés por calor, las placas se incubaron a 40 °C durante 48h, y posteriormente se pasaron a temperatura ambiente. En ambos casos, se monitoreó la germinación cada 24 h hasta 72 h. Como control negativo de estos tratamientos, las semillas fueron sumergidas en agua destilada. Debido a limitación por la cantidad disponible de semillas, se utilizaron 50 semillas para la incubación a temperatura ambiente y 40 para la incubación a 40 °C.

Resultados y discusión

Germinación de semillas en interacción directa con *T. atroviride*

Al analizar la germinación de las semillas de jitomate, luego de 120 h de incubación con el hongo, se observó una clara diferencia en comparación con las semillas incubadas sin hongo, tal como se muestra en las figuras 1 y 2. Del total de semillas cultivadas junto a *T. atroviride*, determinamos 64.5% de germinación, un porcentaje mayor en comparación con las semillas en condición control, donde la germinación fue del 36.5% (figura 1). Este resultado muestra que la presencia de *T. atroviride* promueve la ruptura del estado de dormancia de la semilla, estimulando su proceso de germinación. Nuestros datos coinciden con lo reportado por Macías y colaboradores (2018), en donde evaluaron las respuestas fisiológicas de plantas de tomate (variedad Río Grande) ante la inoculación de *T. atroviride*, y observaron que antes de que ocurriera el contacto físico, el hongo promovió el crecimiento, tanto del hipocótilo como de la raíz primaria (Macías *et al.*, 2018). Sin embargo, en nuestro caso es evidente que el tamaño de la radícula de las semillas germinadas sin el hongo presenta una mayor longitud. Se ha reportado que algunas cepas de *Trichoderma* pueden inducir una redistribución de los reguladores del crecimiento, priorizando el desarrollo de ramificaciones laterales sobre la elongación de la raíz principal (Hermosa *et al.*, 2012; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Es posible que la cantidad de micelio del hongo genere un exceso de metabolitos, presentes de manera constante para las plántulas, en un estadio muy temprano y delicado. Para evitar este efecto, en estudios futuros se considerará disminuir el tiempo de interacción de las semillas con el hongo, para posteriormente transferirlas a tierra, a que continúen con su desarrollo y evaluar sus efectos en crecimiento.

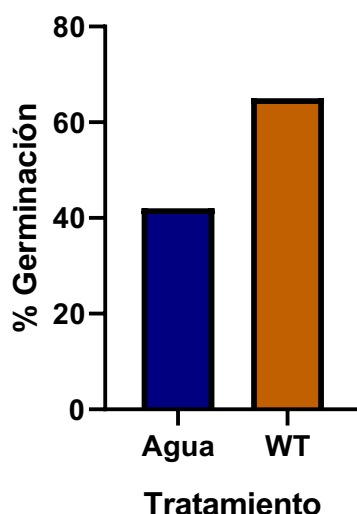


Figura 1. Porcentaje de germinación de semillas de jitomate inoculadas en medio MS 1X, junto a *T. atroviride*.
Fuente: Elaboración propia con GraphPad Prism version 8.0.2 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

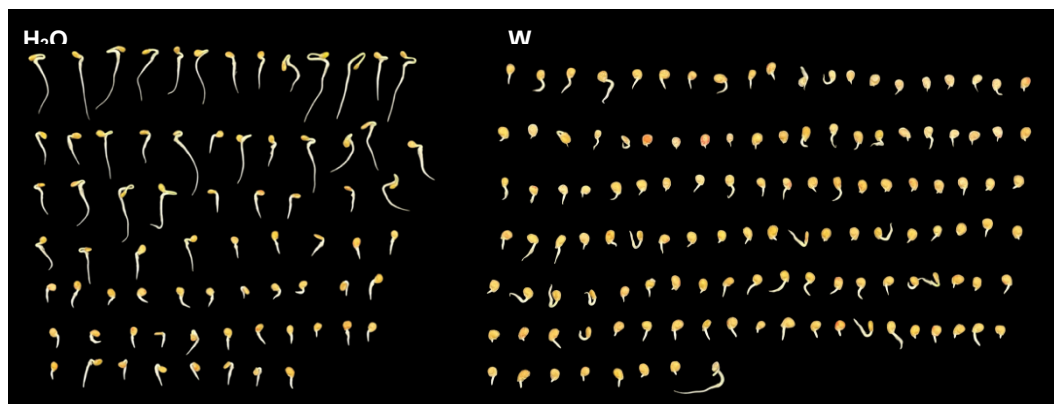


Figura 2. Germinación de semillas de jitomate inoculadas en medio MS 1X, junto a *T. atroviride*.

Germinación de semillas tratadas con sobrenadante

Tratamiento a temperatura ambiente

Para evaluar el efecto sobre la germinación, generado por la exposición de las semillas a los metabolitos producidos por *T. atroviride*, usamos los SN de los cultivos en medio líquido, y determinamos los porcentajes de germinación de las semillas, incubadas a temperatura ambiente. Después de 72 h de incubación, en el control tratado con agua hubo un 28% de germinación, mientras que en el tratamiento con el SN del hongo la germinación fue del 32%, tal como se muestra en la Figura 3.

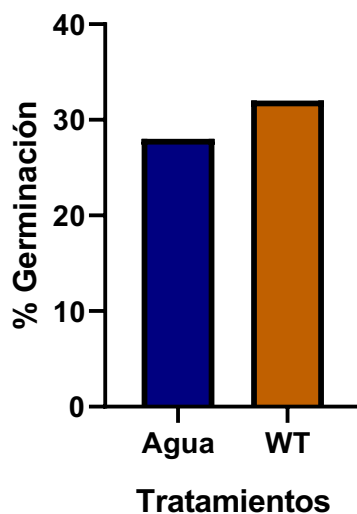


Figura 3. Porcentaje de germinación, a temperatura ambiente, de semillas de jitomate tratadas con metabolitos producidos por *T. atroviride*.

Fuente: Elaboración propia con GraphPad Prism version 8.0.2 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

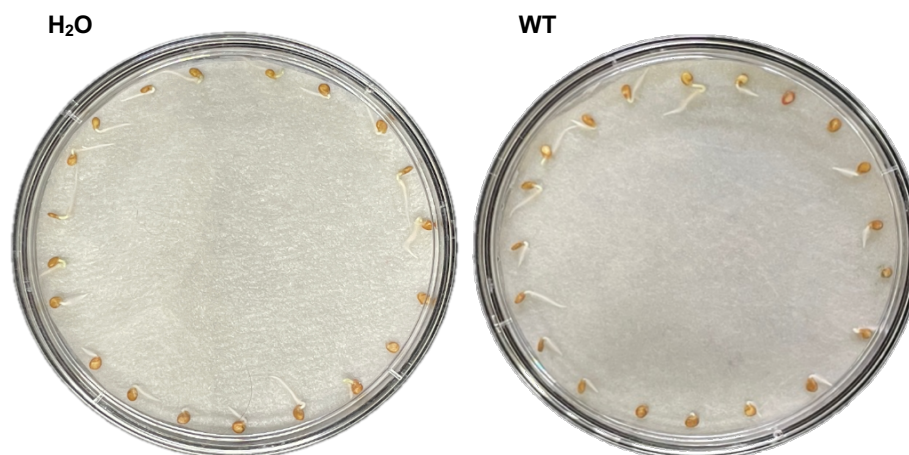


Figura 4. Semillas de jitomate expuestas a temperatura ambiente, tratadas con metabolitos producidos por *T. atroviride*.

La diferencia en los porcentajes de germinación es muy pequeña y no se puede asegurar que los compuestos presentes en el SN estimulan la germinación de las semillas de jitomate. Es necesario incrementar la cantidad de semillas analizadas, para tener datos más robustos y confiables. En otro trabajo se evaluó el efecto de *Trichoderma asperellum* sobre la germinación y la promoción del crecimiento de semillas de tomate (variedad Híbrido Madera F1), y se observó que el tratamiento con una suspensión de conidias mejoró la tasa de germinación en comparación con su tratamiento control, donde utilizaron agua (Sehim *et al.*, 2023). Además, se encontró que *T. asperellum* tiene la capacidad de liberar una fitohormona similar a la auxina, que puede estar relacionada con el incremento significativo de la longitud de la raíz de las plantas de tomate. Es importante considerar que la variabilidad genética entre las especies de *Trichoderma*, influye en la diversidad y concentración de metabolitos sintetizados, así como las características de las variedades vegetales probadas, puede influir en los efectos generados durante la interacción planta-hongo.

Tratamiento a 40°C

Para analizar si los metabolitos, presentes en los SN, pudieran tener un efecto protector cuando las semillas se encuentren bajo un estrés abiótico, como una temperatura más alta, las semillas tratadas con el SN fueron incubadas a 40 °C durante 48 h. Después de 72 h de haberlas pasado a temperatura ambiente, hubo un 14% de germinación en el tratamiento control, con agua. Mientras que para el tratamiento con el sobrenadante hubo un 30% de germinación, como se muestra en la figura 5.

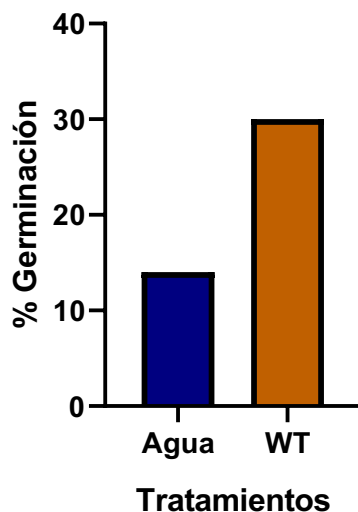


Figura 5. Porcentaje de germinación de semillas de jitomate expuestas a 40° C, tratadas con metabolitos producidos por *T. atroviride*.
Fuente: elaboración propia con GraphPad Prism version 8.0.2 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

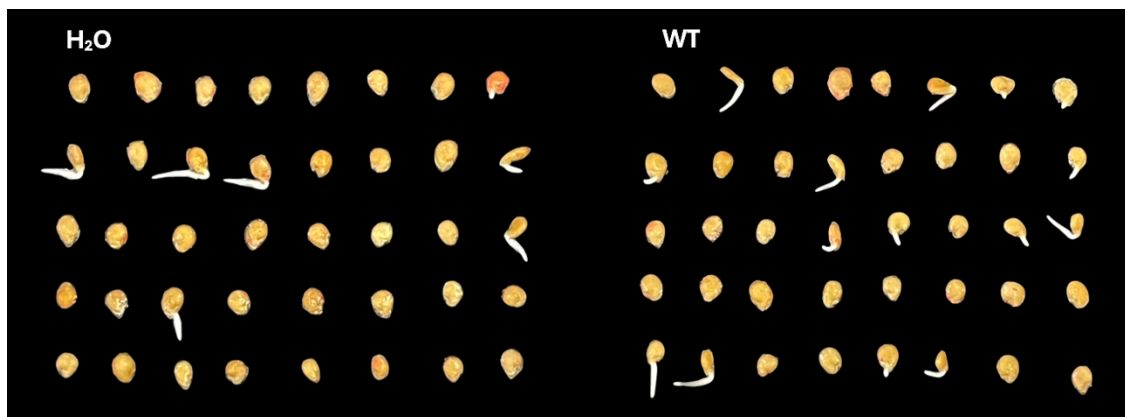


Figura 6. Semillas de jitomate expuestas a 40° C, tratadas con metabolitos producidos por *T. atroviride*.

Esta condición nos permite determinar que el tratamiento a 40 °C disminuyó el porcentaje de germinación, comparado con la incubación a temperatura ambiente (figura 3), donde la diferencia fue del 28% al 14%, evidenciado el impacto de la temperatura sobre la viabilidad de los embriones. Además, sugiere que hay un efecto protector en el proceso de germinación, bajo este estrés por calor, cuando las semillas son tratadas con SN de *T. atroviride*, previo al episodio de estrés, ya que los porcentajes de germinación se mantienen muy cercanos, 32% en temperatura ambiente y 30% en estrés por calor. Estos experimentos deberán ser replicados, para validar la reproducibilidad y para contar con una mayor cantidad de individuos analizados. Sin embargo, se puede observar una tendencia positiva en el impacto de los metabolitos liberados por *T. atroviride* sobre la germinación de semillas de jitomate, expuestas a 40 °C.

Conclusión

El cambio climático es una problemática ambiental que involucra desequilibrios en la naturaleza, incluyendo el aumento de la temperatura, lo que afecta el rendimiento de las semillas para su germinación. Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que el tratamiento de las semillas de jitomate con los metabolitos producidos por *T. atroviride*, tiene un impacto positivo sobre el proceso de germinación bajo la exposición a una temperatura de 40 °C, la cual es posible tener bajo las condiciones de almacenamiento de los lotes de semillas, y también durante la germinación de estas semillas en invernadero o en campo. Estos metabolitos promueven la activación temprana de la semilla, y pueden ayudar a su supervivencia ante el incremento de la temperatura. Sin embargo, las variaciones constantes en la temperatura pueden llegar a superar el umbral de tolerancia fisiológica de las semillas y comprometer su viabilidad. Las perspectivas de esta investigación incluyen probar distintas condiciones de temperatura y dosis de metabolitos, para determinar el rango de protección que permita conservar la viabilidad de la semilla, siendo de alta relevancia para la agricultura.

Bibliografía

- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGRAW-HILL
- Contreras-Cornejo, A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). Trichoderma virens, Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, (149)3 1579–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
- Guzmán, P., Porras, M., Olmedo, V., & Herrera, A. (2019). Trichoderma Species: Versatile Plant Symbionts. *Phytopathology*, 109,(1). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. *Microbiology Society*, 158(1). <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Liu, Y., Zhang, M., Meng, Z., Wang, B., & Chen, M. (2020). Research Progress on the Roles of Cytokinin in Plant Response to Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6574. <https://doi.org/10.3390/ijms21186574>
- Macías-Rodríguez, L., Guzmán-Gómez, A., García-Juárez, P., & Contreras-Cornejo, H. A. (2018). Trichoderma atroviride promotes tomato development and alters the root exudation of carbohydrates, which stimulates fungal growth and the biocontrol of the phytopathogen Phytophthora cinnamomi in a tripartite interaction system. *FEMS Microbiology Ecology*, 9(94). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy137>
- Molina, K., Kisiala, A., Morrison, E., & Emery, R. (2020). Trichoderma Synthesizes Cytokinins and Alters Cytokinin Dynamics of Inoculated Arabidopsis Seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41, 2678-2694. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126552>
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., & Job, D. (2012). Seed germination and vigor. *Plant. Biol.*, 63, 507-533. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>
- Reynosa, E. (2015). *Crisis ambiental global. Causas, consecuencias y soluciones prácticas*. Múnich: GRIN Verlag GmbH.
- Sehim, A. E., Hewedy, O. A., Altammar, K. A., Alhumaidi, M. S., & Elghaffar, R. Y. (2023). Trichoderma asperellum empowers tomato plants and suppresses Fusarium oxysporum through priming responses. *Sec. Microbiotechnology*. 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1140378>
- Vukelic, I., Radic, D., Pecinar, I., Levic, S., Djikanovic, D., Radotic, K., & Pankovic, D. (2024). Spectroscopic Investigation of Tomato Seed Germination Stimulated by Trichoderma spp. *Biology*, 13(5), 340. <https://doi.org/10.3390/biology13050340>