



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp., AISLADAS DE SUELO  
CULTIVADO CON JAMAICA, SU ANTIBIOSIS Y  
MICOPARASITISMO SOBRE *Phytophthora parasitica* Y  
*Fusarium oxysporum*.

TEOLINCACIHUATL ROMERO ROSALES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis titulada: CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp. AISLADAS DE SUELO CULTIVADO CON JAMAICA, SU ANTIBIOSIS Y MICOPARASITISMO SOBRE *Fusarium oxysporum* Y *Phytophthora parasítica*.

Realizada por la alumna: TEOLINCACIHUATL ROMERO ROSALES bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJERO

  
DR. JAVIER HERNANDEZ MORALES

ASESOR

  
DR. ALEJANDRO CASIMIRO MICHEL ACEVES

ASESOR

  
DR. MATEO VARGAS HERNANDEZ

ASESOR

  
DR. GABRIEL LEYVA RUELAS

ASESOR

  
DRA. YOLANDA SALINAS MORENO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 20 de Agosto del 2014

**Esta investigación estuvo financiada por el proyecto Fondo sectorial SAGARPA-CONACYT con clave-163972, “Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento y tolerantes a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable”.**

## **DEDICATORIA**

**A DIOS, mi todo.**

**A mi Esposo.**

**A mis hijos**

**Carlos Julián y Karla Iyari**

**Regalo de Dios hecho a mi medida.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al pueblo de México que por medio de sus impuestos hicieron posible que el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) me apoyara económicamente para la realización de mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados (CP) y a su personal docente por darme la oportunidad de aprender entre sus aulas y laboratorios.

Al Dr. Javier Hernández Morales por creer en mí e impulsar lo que soy. Gracias por todos esos conocimientos y experiencias transmitidos. Agradezco su disposición y tiempo para escuchar mis inquietudes que siempre tuvieron una buena culminación. Muchas gracias por su amistad y el privilegio de conocerlo.

Al Dr. Alejandro C. Michel Aceves por su asesoría, tiempo y facilidades otorgadas durante mi estancia en el Laboratorio de Biotecnología del CSAEGRO. Gracias por todos los conocimientos transmitidos y por todo el apoyo, por alentarme e impulsarme, gracias por la paciencia y esos consejos que me ayudaron a poder culminar este logro, pero principalmente gracias por su amistad.

Al Dr. Mateo Vargas Hernández por su amistad, sus consejos, su tiempo en leer mi trabajo de tesis, así como las asesorías en los análisis estadísticos, y sus acertados comentarios.

Al Dr. Gabriel Leyva Ruelas por su tiempo, asesoría y facilidades otorgadas durante mi formación en su laboratorio.

A la Dra. Yolanda Salinas Moreno por su asesoría y acertados comentarios a mi tesis.

## CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
OBJETIVOS PARTICULARES .....	5
LITERATURA CITADA.....	6
CAPITULO I.....	10
PRODUCCIÓN Y ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> DE QUITINASAS Y GLUCANASAS DE <i>Trichoderma</i> spp., SOBRE <i>Phytophthora parasitica</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> EN JAMAICA. ....	10
1.1 Resumen.....	10
1.2 ABSTRACT .....	12
1.3 INTRODUCCIÓN .....	13
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1.4.1 Cepas en estudio .....	15
1.4.2 Inducción enzimática en medio líquido.....	15
1.4.3 Extracción y Cuantificación de quitinasas .....	16
1.4.5 Bioensayo de antibiosis.....	19
1.5 RESULTADOS Y DISCUSION.....	21
1.6 CONCLUSIONES .....	26
LITERATURA CITADA.....	27
CAPITULO II.....	33
2.1 RESUMEN .....	33

2.2 ABSTRACT .....	34
2.3 INTRODUCCION .....	35
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.4.1 Cepas en estudio .....	37
2.4.2 Inducción del 6PAP por cepas de <i>Trichoderma</i> spp. en medio solido .....	37
2.4.3 Cuantificación del Compuesto volátil 6 PAP .....	38
2.4.4 Antibiosis del 6PAP de <i>Trichoderma</i> spp., sobre <i>Phytophthora</i> parasitica y <i>Fusarium oxysporum</i> . .....	39
2.4.5 Efecto antibiótico del 6PAP, reactivo analítico. ....	40
2.4.6 Antibiosis del 6PAP de <i>Trichoderma</i> spp., sobre <i>Phytophthora</i> parasitica y <i>Fusarium oxysporum</i> . .....	40
2.5 RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
2.5.1 Producción del 6PAP por cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	42
2.5.2 Antibiosis de <i>Trichoderma</i> spp., sobre <i>Phytophthora</i> parasitica y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	43
2.5.3 Efecto antibiótico del 6-pentil- $\alpha$ -pirona, reactivo analítico.....	45
2.4 CONCLUSIONES .....	48
LITERATURA CITADA.....	49
CAPITULO III.....	53
3.1 RESUMEN .....	53
3.2 ABSTRACT .....	55
3.3 INTRODUCCIÓN .....	56
3.3.1 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp. ....	57
3.4 MATERIALES Y METODOS.....	60
3.4.1 Evaluación de la actividad antagónica <i>in vitro</i> de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp., contra cepas de <i>Phytophthora</i> parasítica y <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	60

3.4.2	Días al primer contacto entre hifas.....	61
3.4.3	Zona de intersección .....	61
3.4.4	Capacidad de esporulación de <i>Trichoderma</i> spp. ....	61
3.4.5	Clasificación del antagonismo .....	62
3.4.6	Interacción de aislados de <i>Trichoderma</i> spp., sobre <i>P. parasitica</i> y <i>F. oxysporum</i> . ....	62
3.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
3.5.1	Evaluación de la actividad antagónica in vitro de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp., contra <i>P. parasitica</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	64
3.5.2	Contacto de hifas.....	64
3.5.3	Zona de intersección .....	65
3.5.4	Capacidad de esporulación de <i>Trichoderma</i> spp. ....	68
3.5.5	Clasificación del antagonismo .....	68
3.5.6	Interacción de aislados de <i>Trichoderma</i> spp., sobre <i>P. parasitica</i> y <i>F. oxysporum</i> .....	69
3.5.7	Inhibición de <i>P. parasitica</i> y <i>F. oxysporum</i> por <i>Trichoderma</i> spp. ....	70
3.5.8	Actividad micoparasitica observada bajo la tecnica de MEB.....	74
3.6	CONCLUSIONES .....	77
	LITERATURA CITADA.....	78
	CONCLUSIONES GENERALES .....	84



## INDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Actividad total y específica de quitinasas en cepas de Trichoderma spp.</i> .....	22
<i>Cuadro 2. Actividad total y específica de glucanasas en cepas de Trichoderma spp.</i> .....	23
<i>Cuadro 3. Efecto de las quitinasas de Trichoderma spp., sobre el porcentaje de inhibición de Phytophthora parasitica y Fusarium oxysporum.</i> .....	24
<i>Cuadro 4. Efecto de las glucanasas de Trichoderma spp., sobre el porcentaje de inhibición de Phytophthora parasitica y Fusarium oxysporum.</i> .....	25
<i>Cuadro 5. Producción del 6 pentyl-<math>\alpha</math>-pirona (6PAP) en cepas de Trichoderma spp.</i> .....	43
<i>Cuadro 6. Efecto de la producción de 6PAP de cepas de Trichoderma spp., sobre el crecimiento del micelio de Phytophthora parasitica y Fusarium oxysporum.</i> .....	45
<i>Cuadro 7. Efecto del 6 pentyl-<math>\alpha</math>-pyrona, reactivo analítico sobre el crecimiento del micelio de Phytophthora parasitica y Fusarium oxysporum.</i> .....	47
<i>Cuadro 8. Contacto, sobrecrecimiento y esporulación de especies de Trichoderma sobre Fusarium oxysporum.</i> .....	73
<i>Cuadro 9. Contacto, sobrecrecimiento y esporulación de especies de Trichoderma sobre Phytophthora parasitica.</i> .....	74

## INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Curva de calibración para la cuantificación de quitinasas.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 2. Curva de calibración para la cuantificación de Glucanasas.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 3. Curva de calibración para la cuantificación de Glucanasas para el método de Bradford. .....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 4. Contacto de especies de Trichoderma vs Fusarium oxysporum.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 5. Contacto de especies de Trichoderma vs Phythophthora parasitica. ....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 6. Micoparasitismo de cepas de Trichoderma sobre sobre P. parasitica y F. oxysporum. .</i>	<i>76</i>

**CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp., AISLADAS DE SUELO CULTIVADO CON JAMAICA, SU ANTIBIOSIS Y MICOPARASITISMO SOBRE *Phytophthora parasitica* Y *Fusarium oxysporum*.**

Teolincacihuatl Romero Rosales.

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, 2014.

Se evaluaron cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelos cultivados con jamaica en Tecoanapa y Ayutla, Guerrero y con alta incidencia de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, involucrados en la "Pata prieta"; se realizó una cuantificación y actividad antagonica de quitinasas, glucanasas y 6PAP, y el estudio del micoparasitismo de cinco cepas de *Trichoderma* Ta10, Ta11, Ta6 y Ta9 las cuales pertenecen a la especie *T. asperellum* y Ti14 *T. Inhamatum*, sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*. La producción de quitinasas en la actividad total osciló entre 0.06514 y 0.19288  $\mu\text{mol}$  de N-acetilglucosamina  $\text{h}^{-1}$  y la actividad específica de 4.800 y 0.8917  $\mu\text{mol}$  de N-acetilglucosamina  $\text{h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  proteína. La producción de glucanasas fue de 2.6283 y 1.5492  $\mu\text{mol}$  de glucosa  $\text{h}^{-1}$  de actividad total y para el caso de la actividad específica de 70.518 y 22.312  $\mu\text{mol}$  de glucosa  $\text{h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  proteína. Las quitinasas de las cepas de *T. asperellum* y la cepa de *T. inhamatum*, inhibieron el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* en 33.62 y 97.35% y de *Phytophthora parasitica* 48.02 y 98.22%, respectivamente. Las glucanasas de las cuatro cepas de *T. asperellum* inhibieron el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* en 71.67% y 98%, y en el caso de *Phytophthora parasitica* en 47.6 y 98.02%, respectivamente; mientras que la única cepa de *T. inhamatum* inhibió el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* en 68.02 y 48.87%, y en el caso de *Phytophthora parasitica* en 75% y 98%, respectivamente. Todas las cepas, produjeron 6PAP desde 4.98 a 1615.75  $\text{mg kg}^{-1}$ ; las de mayor producción fueron Ti14 y Ta9 de las especies *T. inhamatum* y *T. asperellum* respectivamente. El 6PAP producido por *Trichoderma* spp., inhibió el crecimiento del micelio de *P. parasitica* y *F. oxysporum* y hasta en un 47.6 y 42.6%, respectivamente. En la evaluación antagónica, se observó fuerte competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis contra *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, siendo las cepas Ti14 (*T. inhamatum*) y Ta10 (*T. asperellum*) las de mejor comportamiento antagónico, respectivamente. Para los días a primer contacto se destacaron los aislamientos Ta10 y Ta9 sobre *P. parasitica*, que alcanzaron clase 1 en la escala usada, donde el antagonista sobrepasó y creció sobre el patógeno cubriendo el 100% del medio de cultivo. Los restantes aislamientos de *Trichoderma* alcanzaron clase 2 de antagonismo. En cuanto al efecto antibiótico, todos los aislamientos inhibieron el crecimiento micelial. Se observó enrollamiento del micelio de todas las especies de *Trichoderma* sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, por medio de Microscopia Electrónica de Barrido.

**Palabras clave:** Control biológico, quitinasas, glucanasas, 6 pentil- $\alpha$ -pirona (6PAP), "pata prieta", Guerrero.

***Trichoderma* spp., NATIVE STRAINS ISOLATED FROM SOIL GROWN WITH JAMAICA,  
ANTIBIOSIS AND MYCOPARASITISM ON *Phytophthora parasitica* AND *Fusarium oxysporum*.**

Teolincacihuatl Romero Rosales.

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, 2014.

The objective of this study was to determine the antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. in *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. The production of the hydrolytic enzymes chitinases and glucanases was quantified by strain of *Trichoderma* spp., as well as their antibiotic effect *in vitro* on the growth of the mycelium of *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. The results of total activity chitinases production oscillated between 0.06514 and 0.19288  $\mu\text{mol}$  of N acetilglucosamine  $\text{h}^{-1}$  and the specific activity 70.518 and 22.312  $\mu\text{mol}$  de glucose  $\text{h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  protein. The total activity of glucanases from 2.6283 and 1.5492  $\mu\text{mol}$  of glucose and the case of the specific activity oscillated from 70.518 to 22.312  $\mu\text{mol}$  de glucose  $\text{h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  protein. The chitinases of *T. asperellum* (Ta9, Ta16, Ta10 and Ta11) and *T. inhamatum* (Ti14), inhibited the growth of the mycelium of *Fusarium oxysporum* from 33.6 to 97.35% and *Phytophthora parasitica* in between 48.025 and 98.225%, respectively. The glucanases that produce the isolates of *T. asperellum* they inhibited the growth of the mycelium of *F. oxysporum* in 71.67% and 98% and in the case of *Phytophthora parasitica* 47.6 and 98.02% respectively. The results obtained under laboratory conditions suggest that *T. asperellum* (Ta9, Ta16, Ta10 and Ta11) for the chitinases and glucanases activity, as well as *T. inhamatum* (Ti14) for the glucanases activity. All strains produced 6PAP ranging from 4.98 to 1615.75  $\text{mg kg}^{-1}$ , and being the most productive Ti14 and Ta9 of the species *T. inhamatum* and *T. asperellum* respectively. The 6PAP produced by *Trichoderma* spp. had a 47.6 and 42.6% mycelial growth inhibition of *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. In this evaluation, competition for the substrate and the antibiotic effect were determined. All tested isolates effectively competed for substrate against *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*, within *Trichoderma* strains Ti14 (*T. inhamatum*) and Ta10 (*T. asperellum*), achieving grade I in the scale used, where the antagonist overgrew the pathogen covering 100% of the culture medium. The remaining isolates of *Trichoderma*, were classified in CLASS II of antagonism. As well as to the antibiotic effect, all isolates inhibited mycelial growth. All natives strais of *Trichoderma* spp. showed an effectiveness, and was proved in electronic microscopy technique, the mycelium of *Trichoderma* spp. enveloped mycelium of *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*.

**Key words:** Biological control, chitinase, glucanase, 6 pentyl- $\alpha$ -pyrone (6PAP), "pata prieta", Guerrero.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La jamaica (*Hibiscus sabdarifa* L.) se cultiva principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. México se encuentra entre los 10 principales países productores, con una superficie mayor de 19,000 ha, los principales estados productores son: Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Michoacán, Campeche, Colima y Sinaloa (SIAP, 2013).

Desde 1943, Crane señala que *Phytophthora parasitica* Dastur es el agente causal de la enfermedad más importante que afecta el cultivo de jamaica, lo cual demerita su calidad y rendimiento. En México, Hernández y Romero (1990) aislaron e identificaron a esta especie en plantas de jamaica procedentes del Estado de Guerrero, con síntomas característicos de la enfermedad conocida como “Pata prieta” y previamente descritos por Crane (1943), que consisten en pudrición negra basal, que gradualmente se une al tejido vivo por medio de una zona no definida, extendiéndose hacia arriba del tallo a una altura de 30 a 35 cm. González-Satín (2008), estimó una incidencia del 40% de “pata prieta” en parcelas en el estado de Guerrero. Recientemente el trabajo de investigación de Ortega (2012), identificó otros fitopatógenos asociados con la enfermedad los cuales fueron: *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani*, *Fusarium incarnatum*, *Phomopsis longicolla*, *Colletotrichum truncatum* y *Glomerella cingulata*, siendo los dos primeros los más patogénicos.

El control de las enfermedades en plantas hasta la fecha se realiza principalmente con productos químicos, los cuales se aplican al follaje, a las semillas y al suelo; en la mayoría de los casos, los fungicidas son efectivos (Harman, 2000); sin embargo, su uso trae como consecuencia efectos nocivos sobre el ambiente debido a su residualidad (Sid Ahmed *et al.*, 2003), lo que ocasiona que se acumule en cuerpos de agua, suelo, plantas y animales; además de que inducen la aparición de resistencia por parte de los fitopatógenos (Ezziyani *et al.*, 2005), sin olvidar el

detrimento que causa en la salud humana (Andrews, 2002). Lo anterior provoca que se tenga que buscar alternativas al uso de los plaguicidas, por lo que la mirada de los investigadores se dirige hacia los microorganismos, que pueden ser usados como agentes de control biológico, de tal forma que el uso de microorganismos para el control de enfermedades en plantas es cada vez mayor (Elad, 2000a).

El concepto de control biológico, lo define Garret (1965), como cualquier condición ó práctica por medio de la cual la sobrevivencia o actividad de un patógeno se reduce a través de la mediación de cualquier otro organismo, excepto el ser humano, con disminución de la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, también los metabolitos microbianos se utilizan como agentes antifúngicos y bacterianos, en la farmacología y agricultura.

El control biológico ideal considera que el antagonista se introduce solamente cuando hay necesidad de una mayor efectividad; la población antagonista no necesita ser más grande que aquella que suprime adecuadamente al inóculo primario del patógeno o al progreso de la enfermedad (Hermosa *et al.*, 2000), lo que quiere decir, que las poblaciones nativas de microorganismos, también participan de manera importante en la fluctuación de la población de un fitopatógeno. Por lo tanto, para utilizar agentes de control biológico y tener una mayor efectividad, es necesario entender los sistemas de cultivo, la epidemiología de la enfermedad, la biología, ecología y dinámica de población de los antagonistas y la interacción entre todas ellas (Howell, 2003).

Una estrategia promisoría en el manejo de enfermedades, para un rango amplio de cultivos, es la introducción de antagonistas, y/o manejar adecuadamente a los nativos; sin embargo, no sólo dependerá del o los microorganismos adecuados, sino también de los métodos y técnicas para introducirlo y mantenerlo en el ecosistema (Elad, 2000b).

Los mecanismos de acción por medio de los cuales los antagonistas afectan a los fitopatógenos son la competencia, antibiosis, micoparasitismo e inducción de mecanismos de resistencia de la planta a diversos fitopatógenos (Guteski *et al.*, 2001). Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, por lo que mientras uno parece ser el principal, en realidad pueden actuar en conjunto (Harman, 2003). En lo que respecta a los fitopatógenos de enfermedades de

tallo y raíz, se pueden considerar dos de los mecanismos señalados, el micoparasitismo y la antibiosis (Inbar y Chet, 1999).

La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo, a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas líticas (Baker y Griffin, 1999) las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y  $\beta$ -1-3-glucanos, de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Harman, 2000b). Entre mayor sea la cantidad de productos metabólicos, el poder antagónico se incrementa (Pezet, *et al.*, 1999).

Cuando un hongo parásito ataca directamente a un hongo patógeno es un micoparásito; para que se lleve a cabo el micoparasitismo, el hongo antagonista produce exoenzimas líticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedero (Amrutha y Eswara, 2014). El micoparasitismo involucra una secuencia de eventos, que incluyen la localización del blanco, a través de un crecimiento quimiotrópico, reconocimiento, ataque, lisis y adquisición de nutrientes. La producción de enzimas líticas y los factores que influyen en estos eventos están ligados entre sí (Gade, 2012). La efectividad de *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos habitantes del suelo está bien demostrada (Jaklitsch, 2006), cuando se aplica en tratamientos preventivos y/o curativos.

Entre los antagonistas estudiados en sistemas que involucran patógenos del suelo, de enfermedades como: secadera, pudriciones de raíz y de la corona, así como marchitez vascular, con sus respectivos agentes causales, se ha evaluado con éxito a: *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pythium*, *Laetisaria*, *Sporidesmium*, *Coniothyrium*, *Verticillium* y *Talaromyces* (Benítez *et al.*, 2004). Los hongos más utilizados para el CB de la secadera y pudriciones radicales son los Hyphomycetes y entre ellos los géneros *Trichoderma*, *Penicillium* y *Gliocladium*, además, de otros géneros con potencial, entre ellos, *Phytophthora*, *Pythium* y *Fusarium* no patogénicos (Montes-Belmont *et al.*, 2003)

Se conoce que la habilidad de *Trichoderma* spp., para reducir los daños en enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, está relacionada a su fuerte capacidad competitiva (Harman y Nash, 2001), al fenómeno de antibiosis, por la producción de enzimas líticas,

metabolitos secundarios y al micoparasitismo (Gajera *et al.*, 2013). Muchas especies de este género son agentes de control biológico con potencial contra un sin número de enfermedades (Michel-Aceves *et al.*, 2005).

Entre las enzimas líticas que producen especies de *Trichoderma* se reportan a las quitinasas, glucanasas (Sastoque, 2006.), proteasas y celulasas. Dichas enzimas están relacionadas en el fenómeno de antibiosis y micoparasitismo al degradar la pared celular y así penetrar y micoparasitar al hospedero (Michel-Aceves *et al.*, 2001). Las quitinasas y glucanasas son las enzimas más reportadas en el control biológico de fitopatógenos. También en la antibiosis, uno de los metabolitos secundarios que se reportan principalmente es el 6-pentyl- $\alpha$ -pyrona (6PAP) (Sharhy-Bagnon, 2000) y varias toxinas como la Pacibasina, Trichodermina, Gliotoxina, Trichodermona y Viridiol (Poole *et al.*, 2008).

Sin embargo el micoparasitismo, como mecanismo de acción, no está completamente entendido, aunque se asume que están involucradas enzimas extracelulares que degradan la pared. Las enzimas quitinolíticas y glucanolíticas, son consideradas ser las que tienen el papel principal en el biocontrol a través de su acción sobre los constituyentes de la pared celular del hongo fitopatógeno (Sastoque, 2006). La acción de las enzimas extracelulares podrían ayudar al micoparasitismo, pero también a la antibiosis, ya que podrían actuar a nivel de puntas de crecimiento de hifas y tubos germinativos de esporas (Michel-Aceves *et al.*, 2005). Por lo anterior, se requiere del empleo más extensivo del control biológico, para ello es necesario la obtención de agentes biocontroladores más eficaces de los que existen actualmente, agentes nativos que sean capaces de competir con los patógenos dentro de un mismo nicho ecológico (Andrews, 2002); para esto es conveniente caracterizar bioquímicamente y distinguir capacidades potenciales de dichos agentes y la medida en que las mismas se expresarán dentro de cada ecosistema.



## OBJETIVOS PARTICULARES

- **Cuantificar la producción de enzimas hidrolíticas quitinasas y glucanasas de cinco cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de suelo cultivado con jamaica.**
- **Cuantificar la producción de 6 Pentyl- $\alpha$ -pyrona (6PAP) de 5 cepas de *Trichoderma* spp aisladas de suelo cultivado con jamaica.**
- **Medir el efecto de antibiosis por enzimas hidrolíticas y 6PAP producidas por las cepas de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento del micelio de agentes causales de la "Pata prieta" *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.**
- **Determinar la actividad micoparasítica de especies de *Trichoderma* sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.**

## LITERATURA CITADA

- Andrews, J.H. 2002. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30:603-635.
- Amrutha, V.G., Eswara, R.N.P. 2014 Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia bataticola*, the causal agent of dry root rot of chickpea. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 5:195-196.
- Baker, R., Griffin, G.J. 1995. Novel approaches to Integrated pest management. En: R. Reuveni (Ed.). *Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens*. Boca Ratón, Florida: CRC Press. 153-182 pp.
- Crane, J.C. 1943. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as a fiber crop. *Economic Plants of interest to the Americas*. USDA 47 pp.
- Ezziyani, M., Requena, M.E., Candela, M.E. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología* 27:143-153.
- Elad, Y. 2000a. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases-control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology* 10:499-507.
- Elad, Y. 2000b. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19:709-714.
- Gajera, H., Domadiya R., Patel, S., Kapopara, M.B., Golakiya, B. 2013. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system a review. *Current Research in Microbiology and Biotechnology* 1:133-142.
- Gonzales-Santin, L.L. 2008. Etiología de la enfermedad “pata prieta de la Jamaica” (*Hibiscus sabadarifa* L.) en Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología agrícola, Chapingo, Edo. de México 63 p.
- Gade, R.M. 2012. Biological and chemical management of *Phytophthora* root rot /collar rot in citrus nursery. *The bioscan* 7: 631-635.

- Garret, S.D. 1965. Ecology of soil-borne plant pathogens. Prelude to biological control. En: Baker, K.F., y Snyder, W.C (Eds.). Toward biological control of soil-borne plant pathogens. California: University California Press. 4-17 pp.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinoor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91:621-627.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T- 22. *Plant Disease* 84:377-393
- Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Díaz-Mínguez, J.M., Castro, C., Monte, E., García-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environment Microbiology* 66:1890-1898.
- Hernández, M.J., Romero, C.S. 1990. Identificación del agente causal de la “pata prieta de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)” y prueba de fungicidas para su control bajo condiciones de invernadero. *Revista Chapingo* 32:50-54.
- Jaklitsch, W.M., Samuels, G.J., Dodd, L.S., Bing-Sheng, L. Druzhinina, S.I. 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in mycology* 55:135–177.
- Howell, C.R., Hanson L.E., Stipanovic R.D. Puckhaber L.S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90:248-252.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4-10.
- Howell, C., Puckhaber, L. 2005. A study of the characteristics of “P” and “Q” strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedlings diseases. *Biological Control* 33: 217-222.
- Inbar, J., Chet, I. 1999. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 141: 2823-2829.
- Michel-Aceves, A. C., Rebolledo-Domínguez, O. Lezama-Gutiérrez, R., Ochoa-Moreno, M. E., Mesina-Escamilla, J. C. Samuels, G. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados

con mango afectados por “Escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista México Fitopatología 19: 154-160.

Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O. Lezama Gutiérrez, R. 2004. Producción y actividad antibiótica del 6 pentyl-alfa-pyrone de *Trichoderma* spp. Sobre especies de *Fusarium*. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 14-21.

Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R., Ariza-Flores, R. Barrios-Ayala, A. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum in vitro*. Revista Chapingo, Serie Horticultura 11:273-278.

Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Solano-Pascacio, L. Y., Ariza-Flores. R., Barrios-Ayala, A. Lezama-Gutiérrez, A. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la “Escoba de Bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana Fitopatología 27:18-26.

Pezet, R., Pont, V., y Tabacchi, R. 1999. Simple analysis of 6-pentyl-alpha-pyrone, a mayor antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. Phytochemical Analysis 10(5):285-288.

Poole, P.R., Ward, B.G., Whitaker, G. 2008. The effects of topical treatment with 6-Pentil-2-pyrone and structural analogues on stem and postharvest rots in kiwifruit due to *Botrytis cinerea*. Journal of the Science of Food and Agriculture 77:81-86.

Sastoque, L. 2006. Aislamiento y selección de microorganismos productores de Quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 134 p.

Sharhy-Bagnon, V., Lozano, P., Saucedo-Castañeda, G., Roussos, S. 2000. Production of 6-Pentil-alpha-pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. Process Biochemistry 36:103-109.

SIAP-SAGARPA. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cultivo de la Jamaica 2003-2014. México. <http://www.siap.gob.mx> (Mayo, 2014).

Sid Ahmed, A., Ezziyyani, M., Pérez, S., Candela, M.E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109:418-426.

## CAPITULO I

### PRODUCCIÓN Y ANTAGONISMO *IN VITRO* DE QUITINASAS Y GLUCANASAS DE *Trichoderma* spp., SOBRE *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* EN JAMAICA.

#### 1.1 Resumen

Se evaluaron cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelos cultivados con jamaica en Tecoaapa y Ayutla, Guerrero y con alta incidencia de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, involucrados en la "Pata prieta"; estas cepas presentaron los mejores resultados en un estudio de cultivos apareados, por lo cual se dio continuidad a la investigación identificando su capacidad como agentes de biocontrol, realizando una cuantificación enzimática. De los filtrados de las enzimas recaudadas, se evaluó la inhibición de los agentes causales de la enfermedad de la "Pata Prieta". La identidad de estas son Ta10, Ta11, Ta6 y Ta9 las cuales pertenecen a la especie *T. asperellum* y Ti14 *T. inhamatum*. Se cuantificó la producción de las enzimas hidrolíticas: quitinasas y glucanasas, así como su efecto antibiótico *in vitro* sobre el crecimiento del micelio de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*. La producción de quitinasas en la actividad total osciló entre 0.06514 y 0.19288  $\mu\text{mol}$  de N-acetilglucosamina  $\text{h}^{-1}$  y la actividad específica de 4.800 y 0.8917  $\mu\text{mol}$  de N-acetilglucosamina  $\text{h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  proteína. La producción de glucanasas fue de 2.6283 y 1.5492  $\mu\text{mol}$  de glucosa  $\text{h}^{-1}$  de actividad total y para el caso de la actividad específica de 70.518 y 22.312  $\mu\text{mol}$  de glucosa  $\text{h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  proteína. Las quitinasas de las cepas de *T. asperellum* y la cepa de *T. inhamatum*, inhibieron el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* en 33.62 y 97.35% y de *Phytophthora parasitica* 48.02 y 98.22%, respectivamente. Las glucanasas de las cuatro cepas de *T. asperellum* inhibieron el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* en 71.67% y 98%, y en el caso de *Phytophthora parasitica* en 47.6 y 98.02%, respectivamente; mientras que la única cepa de *T. inhamatum* inhibió el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* en 68.02 y 48.87%, y en el caso de

*Phytophthora parasitica* en 75% y 98%, respectivamente. Los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio sugieren que las cepas de *T. asperellum* por la actividad de quitinasas y glucanasas, así como *T. inhamatum* por la actividad de glucanasas, tienen alto potencial como agentes de control sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.

**Palabras clave:** Control biológico, quitinasas, glucanasas, "pata prieta", Guerrero.

**PRODUCTION AND IN VITRO ANTAGONISM of chitinases and glucanases from *Trichoderma spp.*, ON *Phytophthora parasitica* AND *Fusarium oxysporum* IN ROSELLE.**

**1.2 ABSTRACT**

The production of the hydrolytic enzymes chitinases and glucanases was quantified by strain of *Trichoderma spp.*, as well as their antibiotic effect *in vitro* on the growth of the mycelium of *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. The results of total activity chitinases production oscillated between 0.06514 and 0.19288  $\mu\text{mol}$  of N acetilglucosamine  $\text{h}^{-1}$  and the specific activity 70.518 and 22.312  $\mu\text{mol}$  de glucose  $\text{h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  protein. The total activity of glucanases from 2.6283 and 1.5492  $\mu\text{mol}$  of glucose and the case of the specific activity oscillated from 70.518 to 22.312  $\mu\text{mol}$  de glucose  $\text{h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  protein. The chitinases of *T. asperellum* (Ta9, Ta16, Ta10 and Ta11) and *T. inhamatum* (Ti14), inhibited the growth of the mycelium of *Fusarium oxysporum* from 33.6 to 97.35% and *Phytophthora parasitica* in between 48.025 and 98.225%, respectively. The glucanases that produce the isolates of *T. asperellum* they inhibited the growth of the mycelium of *F. oxysporum* in 71.67% and 98% and in the case of *Phytophthora parasitica* 47.6 and 98.02% respectively. The results obtained under laboratory conditions suggest that *T. asperellum* (Ta9, Ta16, Ta10 and Ta11) for the quitinases and glucanases activity, as well as *T. inhamatum* (Ti14) for the glucanases activity, they have potential as biocontrol agents on the two species of *Fusarium* involved in the etiology of the "Pata prieta".

**Key words:** Biological control, chitinase, glucanase, "pata prieta", Guerrero.



### 1.3 INTRODUCCIÓN

La enfermedad “Pata prieta” de la jamaica ocasionada por *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, es una de las principales limitantes fitosanitarias del cultivo en la zona productora más importante del estado de Guerrero, con pérdidas que rebasan el 50% de la producción (Escalante, 2011). Los métodos de control químico han demostrado ser eficientes, pero han generado una creciente y justificada preocupación por la contaminación, el deterioro ambiental y el desequilibrio de los ecosistemas (Torres y Capote, 2004).

La finalidad del biocontrol es cambiar el equilibrio en poblaciones de organismos nocivos, normalmente mediante un incremento artificial importante en la población del enemigo natural para favorecer la producción agrícola (Harman, 2006), especies del género *Trichoderma* han acaparado la atención como agentes de biocontrol por lo que constituye una alternativa al control químico (Stefanova, 2007; Bhale *et al.*, 2013),.

La antibiosis, es el fenómeno mediante el cual un antagonista inhibe o destruye a un organismo a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas líticas (Mohiddin *et al.*, 2010; Amrutha *et al.*, 2014) entre mayor sea la cantidad de productos metabólicos mayor es el efecto de antibiosis, tal es el caso de enzimas degradantes de la pared celular de hongos fitopatógenos (Christy *et al.*, 2012).

Los principales mecanismos por los cuales *Trichoderma* spp. lleva a cabo su antagonismo contra los patógenos de las plantas incluyen: la competencia por espacio y nutrientes, la producción de compuestos inhibidores, micoparasitismo, la inactivación de enzimas del agente patógeno, inducción de la resistencia, antibiosis por la producción de enzimas líticas y otros metabolitos secundarios (Abo-Elyousr *et al.*, 2014). Esta actividad antifúngica involucra la producción de proteasas, celulasas, quitinasas y glucanasas, que afectan la integridad de las membranas fungosas y la degradación de la pared celular de los hongos (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008). Se ha descrito que el proceso de infección se lleva a cabo mediante la excreción de enzimas líticas que incluyen  $\beta$ -1,3-glucanasas, proteasas y quitinasas, que le permiten degradar la pared celular del hospedero (Guigon-López *et al.*, 2013). A nivel celular causan vacuolación, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Martínez *et al.*, 2008). En el caso de Oomycetes,

cuya pared celular contiene  $\beta$ -1,3-glucano y celulosa, se sugiere la  $\beta$ -1,3-glucanasa como la enzima principal en la lisis de la pared celular durante la acción micoparasítica (Michel-Aceves *et al.*, 2005), debido a esto existe una correlación positiva entre la cantidad de enzimas producidas y el porcentaje de micoparasitismo para obtener una reducción de la enfermedad (Reyes *et al.*, 2008).

Los hongos del género *Trichoderma* son potentes agentes para el control biológico, debido a que atacan una amplia variedad de hongos fitopatógenos foliares y del suelo, de los cuales los mas reportados son *Rizoctonia solani*, *Colletotrichum* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Phytium ultimum*, *Verticillium* spp. y *Thelaviopsis* spp., entre otros (Michel-Aceves *et al.*, 2009; Bhale *et al.*, 2013; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008), lo que ha permitido utilizarlos exitosamente (Michel-Aceves *et al.*, 2009). En particular, *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma inhamatum*, son especies con amplio espectro de control (Guigon-López *et al.*, 2013), por la habilidad de secretar enzimas hidrolíticas, quitinasas y glucanasas, las cuales están involucradas en el control biológico de fitopatógenos (González *et al.*, 2012). Debido a esto es conveniente precisar el efecto de las quitinasas y glucanasas producidas por *Trichoderma* spp., sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, que atacan partes basales del cultivo de la jamaica, ya que esto permitiría formular estrategias de manejo para reducir las aspersiones de los fungicidas químicos y disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad conocida como "Pata prieta". Con base en lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron: cuantificar la producción de quitinasas y glucanasas en diferentes cepas de *Trichoderma* spp., y evaluar su efecto antibiótico sobre el crecimiento del micelio *in vitro* de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.

## 1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.4.1 Cepas en estudio

Se utilizaron cuatro cepas de *Trichoderma asperellum* (Ta6, Ta9, Ta10 y Ta11) y una cepa de *Trichoderma inhamatum* (Ti14), estas cepas presentaron los mejores resultados en un estudio de cultivos apareados, fueron aisladas de suelo cultivado con jamaica en municipios productores del Estado de Guerrero. Estas cepas fueron caracterizadas e identificadas molecularmente por Esparza (2009).

Las cepas fitopatógenas, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora parasitica* agentes causales de la “Pata prieta” fueron proporcionadas por el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos, aisladas y caracterizadas molecular y morfológicamente (Ortega, 2012), estas cepas fueron obtenidas de plantas con síntomas de la enfermedad, colectadas en Tecoaapa y Ayutla, Guerrero, donde se tiene alta incidencia de este problema fitosanitario.

### 1.4.2 Inducción enzimática en medio líquido

En el laboratorio de Biotecnología del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, se subcultivaron en un medio de papa-dextrosa-agar (PDA, Sigma) *Trichoderma asperellum* (cepas 6, 9, 10 y 11) y *Trichoderma inhamatum* (cepa 14), en placas Petri de 9 cm y se incubaron a temperatura ambiente de 38°C, en cultivo estático durante 5 días, momento en que se tomó el micelio para el desarrollo del ensayo (Adams, 2004).

Se utilizó un medio de cultivo líquido para la producción de las quitinasas y glucanasas por cada una de las cepas evaluadas, según la metodología propuesta por Soller *et al.* (2010). En matraces Erlenmeyer de 250 ml se colocaron 50 ml de medio de cultivo formado por (10 g de KNO<sub>3</sub>; 5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2.5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 2 mg de FeCl<sub>3</sub>; 150 ml de jugo V8; 10 g de polivinilpirrolidona (Sigma, St. Louis, MO) y 100 ml de agua desionizada. El medio se adicionó con 1% (p:v) de quitina en hojuelas (Sigma) para inducir la producción de quitinasas y con 0.1% (p:v) de laminarina para la inducción de las glucanasas. El pH del medio se ajustó a 6.0 y se esterilizó a 121°C por 20 min. Posteriormente se inoculó con 1 ml de una suspensión de conidios con una concentración final de  $1 \times 10^6$  conidios por ml para luego incubar a 25°C 12 h

luz/oscuridad y 40 % de humedad relativa en un agitador rotatorio a 180 rpm durante 5 días para quitinasas y 8 días para glucanasas (Mohiddin *et al.*, 2010).

Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo que contenía las enzimas de interés se separó de la biomasa por filtración con papel filtro Whatman No.1; posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos, las partículas residuales que aún permanecieron en el sobrenadante se separaron por filtración a través de fibra de vidrio (Ramotr *et al.*, 2000). Inmediatamente después, la mitad del filtrado se utilizó para las pruebas de inhibición *in vitro* y la otra mitad para determinar la cantidad de quitinasas y glucanasas.

#### **1.4.3 Extracción y Cuantificación de quitinasas**

La producción de quitinasas se cuantificó con la metodología propuesta por Bara *et al.*, (2003). Se marcaron 4 tubos, A, B, C y D, a cada uno se le agregó 1 ml de filtrado y 3.8 mg de quitina purificada en polvo (Sigma, St. Louis, MO) en 1 ml de amortiguador McIlvaine de citratos pH 5. Sólo los tubos A se sumergieron en agua hirviendo por 10 min para destruir la actividad enzimática; después, todos los tubos se incubaron por 24 h a 37°C en baño María.

Pasadas las 24 h se tomó una alícuota de 0.5 ml de cada tubo (A-D) y la reacción se detuvo al colocar todos los tubos en agua hirviendo por 10 min, a cada tubo se le agregó 0.1 ml de solución 0.8 M de tetraborato de Potasio y se volvió a hervir por 3 minutos, se incubaron por 20 minutos a 36-38°C. Pasado ese tiempo se dejaron enfriar y a cada tubo se le agregó 3 ml de p-diametilaminobenzaldehído (DMAB) (Sigma). Los tubos se homogenizaron en un vortex por 1 min y la absorbancia de cada tubo se midió a 500 nm en un espectrofotómetro (Lasso Spec III, Lasso Biotech LTDA), contra un reactivo blanco (Adams, 2004).

La curva de calibración se realizó en concentraciones de 0 a 125 µg de N-acetilglucosamina en 0.5 ml en amortiguador McIlvaine pH 5.0. Las variables utilizadas para cuantificar la actividad de las quitinasas fueron la actividad total (AT) y específica (AE). La AT y AE de las quitinasas se determinó por cantidad de N-acetilglucosamina liberada, según Harman *et al.* (2003); la AT, se expresó en µmoles de N-acetilglucosamina h<sup>-1</sup> y la AE, en µmoles de N-acetilglucosamina mg<sup>-1</sup> de proteína h<sup>-1</sup>. El contenido de proteínas de la solución enzimática se determinó con el reactivo de Folin Fenol de acuerdo a Lowry *et al.* (1951).

Los datos se sometieron a un análisis de varianza usando el modelo correspondiente a un diseño completamente al azar y prueba de comparación múltiple de medias mediante el método de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el programa estadístico SAS (SAS, 2010).

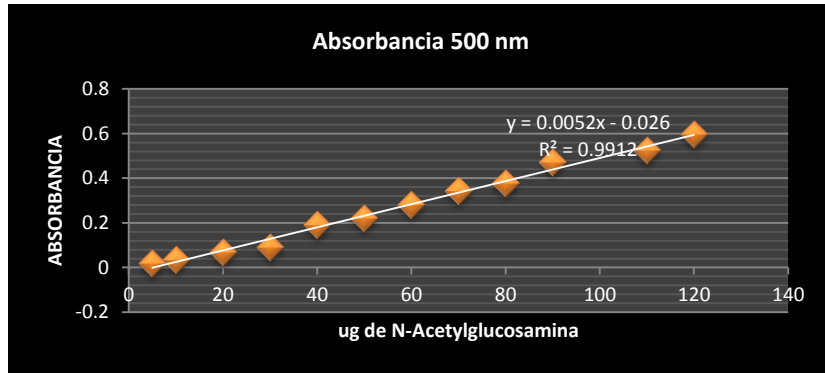


Figura 1. Curva de calibración para la cuantificación de quitinasas

#### 1.4.4 Extracción y Cuantificación de Glucanasas

La producción de las glucanasas se determinó de acuerdo con González *et al.* (2010), se utilizaron los filtrados obtenidos de las cepas de *Trichoderma* spp. con 8 días de incubación. Se marcaron 2 tubos (X y Y) para cada cepa y a cada tubo se le agregó 1 ml de una solución de 10  $\text{mgml}^{-1}$  de laminarina en solución 0.1 M de amortiguador de citratos pH 5. Solo a los tubos "X" se le agregó 1 ml del filtrado del cultivo y se incubaron todos los tubos 4 h a 40 °C en baño María (Bara *et al.*, 2003).

Después de la incubación, a los tubos "Y" se les agregó 1 ml del filtrado, posteriormente se adicionaron a todos los tubos 2 ml de reactivo de Cobre (CR) e inmediatamente se detuvo la reacción por inmersión de los tubos en agua hirviendo durante 10 min para destruir la actividad enzimática. Luego se agregaron 2 ml de reactivo de arsenomolibdato y se aforó a 25 ml, con agua destilada. La solución se homogenizó en un vortex por 1 minuto, para después medir la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21D, Milton Roy, Rochester, NY). De la misma manera se hizo con un blanco al cual se le realizó el mismo procedimiento que a las

muestras, pero en lugar del filtrado de las cepas se utilizó agua destilada y desionizada (Harman, 2006).

El CR se preparó minutos antes de utilizarlo con cuatro partes del reactivo Cu I y una del reactivo Cu II. El reactivo I se formó con 16.1 g de tartrato de Sodio y Potasio  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 24 g de carbonato de Sodio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 16 g de bicarbonato de sodio  $\text{NaHCO}_3$ , 80.44 g de sulfato de Sodio  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 800 ml de agua. El reactivo II se formó con 4 g de sulfato de Cobre  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 36 g de sulfato de Sodio  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 200 ml de agua. En ambos reactivos los componentes se calentaron hasta disolver y después, ya fríos, se corrigió el volumen original. El reactivo de arsenomolibdato se preparó con 25 g de  $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 450 ml de agua, 21 ml de ácido sulfúrico concentrado  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 3 g de arseniato disódico  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 25 ml de agua (Harman *et al.*, 2003) y se conservó a 37°C por 2 días antes de utilizarse (Mohiddin *et al.*, 2010).

La curva de calibración se realizó con las siguientes concentraciones de glucosa: 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300 y 400  $\mu\text{gml}^{-1}$  (Bruce *et al.*, 1995). Las diferencias en las lecturas de absorbancia (X-Y) se utilizaron para establecer la actividad de glucanasas por extrapolación de la gráfica estándar. La actividad de las glucanasas de cada filtrado se calculó con cuatro réplicas de análisis.

La actividad de  $\beta$ -(1-3)-glucanasa se determinó por la cuantificación de glucosa libre de laminarina, utilizando el reactivo glucosa-oxidasa (Sigma). La actividad específica se expresó en  $\mu\text{moles de glucosa mg}^{-1}$  de proteína  $\text{hora}^{-1}$ , de acuerdo a Madi *et al.*, (1997). La actividad de la glucanasa se expresa en función de la cantidad de proteína en el extracto enzimático, por lo que el contenido de proteínas se determinó con el reactivo de Folin Fenol de acuerdo a Lowry *et al.* (1951) y corroborado con el método de Bradford (1976), por su alta sensibilidad, el cual consiste en la formación de un compuesto de absorción que vira de color azul a azul verdoso y que absorbe a 500 nm. La curva patrón que se utilizó se realizó con suero de albúmina de bovino en un rango de 0 a 15.0  $\mu\text{g}$  de proteína  $\text{ml}^{-1}$  a 500 nm.

Las variables utilizadas para cuantificar la actividad de las glucanasas fueron la Actividad Total (AT) y Actividad Especifica (AE), considerando un diseño experimental completamente al azar

con 4 repeticiones. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de diferenciación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ) con el programa estadístico SAS (SAS, 2010).

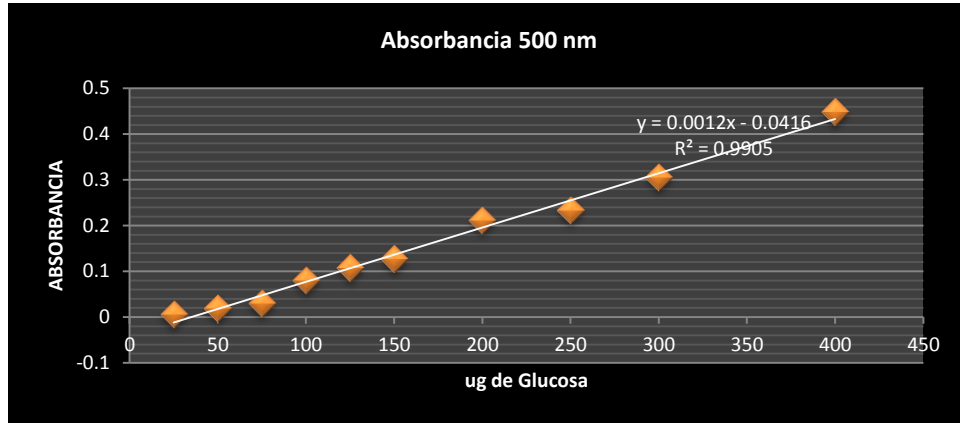


Figura 2. Curva de calibración para la cuantificación de Glucanasas.

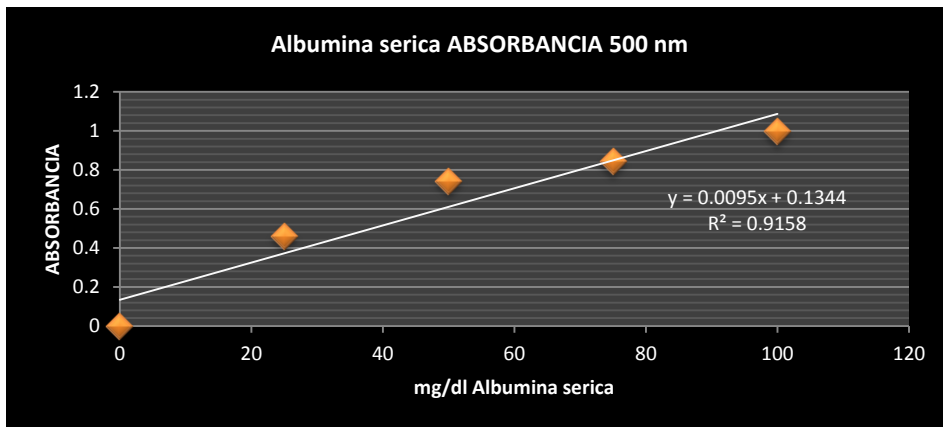


Figura 3. Curva de calibración para la cuantificación de Glucanasas para el método de Bradford.

#### 1.4.5 Bioensayo de antibiosis

Una fracción del filtrado obtenido de los medios de cultivo con la enzima (quitinasas o glucanasas, según el caso) se purificó utilizando filtro millipore 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Co., Bedford, MA) y 10 ml de filtrado estéril de cada uno de los tratamientos, se mezcló en proporción 1:1 (v:v) en PDA (5.9%) antes de solidificar. Cada caja petri se inoculó con un disco de 5 mm de diámetro de PDA (3.9%) con micelio de colonias de 10 días en crecimiento activo de

*Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*; se incubaron a 25 °C, 12 horas luz/oscuridad y 40% de humedad relativa por 8 días. Se utilizaron como testigo, cajas petri inoculadas con el micelio de *F. oxysporum* y *P. parasitica*, respectivamente, más agua destilada estéril en lugar de filtrado (Michel-Aceves *et al.*, 2004). El diámetro de las colonias, expresado en milímetros, se registró cada dos días hasta 8 días después de la inoculación, tiempo en el cual el testigo llenó la superficie de la caja petri. Los datos del efecto antibiótico se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. parasitica* y *F. oxysporum*; se realizaron cinco tratamientos de glucanasas y cinco tratamientos de quitinasas. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. A los datos en porcentaje, antes de someterlos al análisis de varianza y prueba de comparación de medias mediante el método de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), con el programa estadístico SAS (SAS, 2010), se les realizó la transformación angular ( $\arcsin(\sqrt{\%})$ ). También se llevó a cabo un análisis de correlación entre las variables.



## 1.5 RESULTADOS Y DISCUSION

Las quitinasas y las glucanasas están involucradas en la interacción parasítica de las especies de *Trichoderma* con sus hospedantes (Michel-Aceves *et al.*, 2005). *T. asperellum* es una de las especies menos estudiadas debido a una mala identificación, muchas cepas antes identificadas morfológicamente como *T. harzianum* ahora son frecuentemente *T. asperellum*, debido a esto no hay precedentes de *T. asperellum*; podemos encontrar antecedentes como *T. harzianum* donde se pueden corroborar los resultados de esta investigación (Vinale *et al.*, 2008); no obstante, se han purificado y caracterizado endoquitinasas y  $\beta$ -1.3-glucanasas de esta especie y se ha analizado la expresión de estas enzimas ante diferentes fuentes de carbono y se ha demostrado que tienen gran capacidad antibiótica (González *et al.*, 2012) como se presenta en los resultados siguientes.

Todas las cepas de *Trichoderma* spp., fueron capaces de producir quitinasas y glucanasas. Los resultados obtenidos coinciden con los encontrados con Michel-Aceves *et al.* (2001) y Harman *et al.* (2010), con cantidades muy heterogéneas, aún en cepas de la misma especie.

En la producción de ambas enzimas quitinasas y glucanasa, el análisis de varianza detectó diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ). La cantidad de quitinasas (N-Acetil-D-glucosamina) varió de 4.80 a 0.89  $\mu\text{mol h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  de proteína (Cuadro 1), y la de glucanasas (glucosa) entre 70.51 y 22.31  $\mu\text{mol h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  de proteína (Cuadro 2). En quitinasas, la mayor producción la presentó *T. asperellum* (Ta9) con 4.80  $\mu\text{mol}$ , seguida en orden decreciente por las cepas Ta6 y Ti14, con 3.605 y 3.315  $\mu\text{mol}$ , y con poca significancia de producción de la enzima lítica las cepas de *T. asperellum* Ta11 y Ta10 con 3.22 y 0.89  $\mu\text{mol}$  respectivamente (Cuadro 2). Los niveles producidos de quitinasas en la presente investigación fueron altamente significativos a las indicadas por Lorito *et al.* (1999), con valores máximos de 1.72  $\mu\text{mol}$  y Michel-Aceves *et al.*, (2005), con valores de 2.294; sin embargo, inferiores a las reportadas por Marcello *et al.* (2010), con 4.4  $\mu\text{mol}$  y Madi *et al.* (1997) con 15.0  $\mu\text{mol}$ . En glucanasas, *T. inhamatum* (Ti14) obtuvo la mayor producción, con 70.51  $\mu\text{mol}$  glucosa, estadísticamente diferente al resto de las cepas; siguieron *T. asperellum* Ta10, Ta9 y Ta6 con 65.35, 54.44 y 36.72,  $\mu\text{mol}$ . *T. asperellum* (Ta11), presentó la menor actividad específica, con 22.31  $\mu\text{mol}$  (Cuadro 1).

Los valores obtenidos son superiores a los indicados por Soler *et al.* (1999) y Bruce *et al.* (1995); González *et al.*, (2012); Michel-Aceves *et al.*, (2005), con cantidades máximas de 40.5, 60.6, 6.6, y 5.3  $\mu\text{mol}$  de glucosa, respectivamente. Clavijo y Cotes (2000), indicaron que varias cepas de *Trichoderma* spp., producían antibióticos y enzimas líticas intracelulares, no obstante de existir datos donde la producción de enzimas y otros metabolitos por cepas de *Trichoderma* es muy variable y no está relacionada con la habilidad para controlar enfermedades.

**Cuadro 1.** Actividad total y específica de quitinasas en cepas de *Trichoderma* spp.

CEPA	ESPECIE	ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECIFICA
		$\mu\text{mol}$ de N-Acetyl-D-glucosamina $\text{h}^{-1}$	$\mu\text{mol}$ de N-Acetyl-D- glucosamina $\text{h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ Proteína
Ta9	<i>T. asperellum</i>	0.06 a	4.80 a
Ta6	<i>T. asperellum</i>	0.03 b	3.60 b
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	0.03 bc*	3.31 bc*
Ta11	<i>T. asperellum</i>	0.03 c	2.32 c
Ta10	<i>T. asperellum</i>	0.01 d	0.89 d

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

Sin embargo, Vinale *et al.* (2008), indican que a mayores cantidades del antagonico adicionado al suelo, se reducen los daños por *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* y *Pythium* spp., ello es posible porque la pared celular de los hongos fitopatógenos está compuesta principalmente por  $\beta$ -1.3-glucanos y quitina, con celulosa encontrada en los Oomycetes (Yedida, 2003).

Asimismo, El-Katatny *et al.* (2001), indican que a mayor concentración enzimática se reduce la germinación de esporas de *B. cinerea*, más aún si existe sinergismo positivo de actividad quitinolítica y gluconolítica.

En la prueba *in vitro* se observaron diferencias significativas en el efecto de antibiosis por actividad de las quitinasas y glucanasas, todas las cepas en diferentes grados, lograron inhibir el crecimiento del micelio de *P. parasitica* y *F. oxysporum*. A mayor concentración el efecto sobre los fitopatógenos se hace evidente; todas las cepas de *Trichoderma* lograron manifestarlo en gran significancia.

**Cuadro 2.** Actividad total y específica de glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp.

CEPA	ESPECIE	ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECIFICA
		$\mu\text{mol de Glucosa h}^{-1}$	$\mu\text{mol de Glucosa h}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ Proteína}$
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	2.62 a	70.51 a
Ta10	<i>T. asperellum</i>	2.35 ab*	65.35 ab*
Ta9	<i>T. asperellum</i>	2.24 b	54.44 b
Ta6	<i>T. asperellum</i>	1.78 c	36.72 c
Ta11	<i>T. asperellum</i>	1.54 d	22.31 d

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

El Bioensayo de antibiosis permitió observar diferencias ( $P \leq 0.01$ ) entre cepas para ambas enzimas; en quitinasas, los valores oscilaron entre 97.5 a 33.6% (Cuadro 3). *T. asperellum* (Ta9) produjo la mayor cantidad de esta enzima y presentó efecto antagónico sobre el PDA. Con cantidades superiores a 4 mmol de N-Acetyl-glucosamina se inhibió al 97.5% y 98.22% sobre *F. oxysporum* y *Phytophthora parasitica*, respectivamente. Ta6, Ti14, Ta11 y Ta10 inhibieron en un 57.17%, 48.87%, 44.62% y 33.62% respectivamente. Con Cantidades inferiores a los 3 mmol de N-Acetyl-glucosamina sobre *F. oxysporum* y en el caso de *Phytophthora parasitica* la inhibición se presentó en un 74.37%, 68.02%, 56.30% y 48.02% respectivamente.

La actividad enzimática de las glucanasas establecieron amplio efecto antibiótico de *T. inhamatum* (Ti14) y *T. asperellum* (Ta10) que lograron las producciones más altas y manifestaron mayor efecto de inhibición del crecimiento del micelio en PDA; a concentraciones superiores a los 65 mmol de glucosa inhibieron en un 98% y 95% a *F. oxysporum*,

respectivamente. Para el caso específico de inhibición del micelio en *Phytophthora parasitica*, las cepas *T. asperellum* (Ta9 y Ta11) presentaron el mayor efecto antibiótico con un 97% y 92%, respectivamente (Cuadro 4). Los medios basales suplementados con glucanasas demostraron amplio efecto antagónico, con resultados altamente significativos.

Se hace evidente que para el caso de glucanasas *Phytophthora parasitica* es más susceptible a la acción de esta enzima; lo anterior puede deberse a que la pared celular de *Fusarium oxysporum* tiene una capa externa de glicoproteínas que cubre a la interna compuesta de quitina y glucanos, de tal manera que resiste más a la actividad de quitinasas y glucanasas y se requiere mayor concentración de enzimas para degradarla (Sanmartin *et al.*, 2012).

**Cuadro 3.** Efecto de las quitinasas de *Trichoderma* spp., sobre el porcentaje de inhibición de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.

CEPA	ESPECIE	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phytophthora parasítica</i>
Ta9	<i>T. asperellum</i>	97.35 a	48.22 a
Ta6	<i>T. asperellum</i>	57.17 b	34.37 a
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	48.87 c	38.02 b
Ta11	<i>T. asperellum</i>	44.62 c	36.30 b
Ta10	<i>T. asperellum</i>	33.60 d*	28.02 b*

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

González *et al.* (2012), indicaron que la actividad quitinolítica y gluconolítica de *T. asperellum* parecen estar biológicamente más activas y efectivas que otras enzimas de otras fuentes, contra un amplio rango de hongos, inhiben totalmente la germinación de esporas de varios hongos fitopatógenos, entre ellos, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*, y *Phytium ultimum*, a concentraciones de 200-300 mg ml<sup>-1</sup>.

En general, los resultados obtenidos concuerdan con lo mencionado por El Katatny *et al.*, (2001) y Guigon-López *et al.* (2013), en el sentido de que las enzimas líticas producidas por *Trichoderma* spp., son las responsables de la inhibición in vitro.

**Cuadro 4. Efecto de las glucanasas de *Trichoderma* spp., sobre el porcentaje de inhibición de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.**

CEPA	ESPECIE	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	98.03 a	75.75 c
Ta10	<i>T. asperellum</i>	95.75 ab	73.92 cd
Ta9	<i>T. asperellum</i>	93.55 b	97.62 a
Ta6	<i>T. asperellum</i>	76.05 c	71.65 d
Ta11	<i>T. asperellum</i>	47.62 d	92.92 b

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

## 1.6 CONCLUSIONES

Todas las cepas (Ti 14 Ta10, Ta11, Ta6 y Ta9) fueron capaces de producir enzimas líticas, se obtuvo mayor cantidad de glucanasas que de quitinasas, los valores son diferentes, aún en cepas de la misma especie.

*Trichoderma asperellum*, cepa Ta9 fue claramente la de mayor producción de quitinasas y presentó resultados diferentes a las otras cepas. Por su parte *Trichoderma inhamatum* cepa Ti14 presentó los mayores valores en la producción de glucanasas, pero las diferencias en resultados no fueron tan marcadas en relación a *T. asperellum* Ta10 y Ta9.

Se manifestó efecto evidente de antibiosis por quitinasas en aquellas cepas que producen desde  $1.0 \mu\text{mol N-acetyl-Dglucosamina h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  de proteína de esta enzima y por glucanasas, desde  $65.5 \mu\text{mol de glucosa h}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$  de proteína. *Trichoderma asperellum* cepa Ta9 para *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, inhibió completamente el desarrollo del micelio.

Las cepas *Trichoderma asperellum* Ta9 y *Trichoderma inhamatum* Ti14, por la producción de quitinasas y glucanasas tienen mejor efecto antagónico que las otras cepas sobre agentes causales de la "Pata Prieta" en condiciones de laboratorio, y son candidatos potenciales para utilizarse en el control de fitopatógenos bajo condiciones de invernadero y campo. Sin embargo, para el caso de las Glucanasas también se pueden recomendar *Trichoderma asperellum* Ta10 y Ta9.

Considerando simultáneamente que *T. asperellum* Ta9 fue la mejor para las Quitinasas pero también fue muy similar a Ti14 y Ta10 en la producción de Gucanasas, sería la opción mas recomendable.

## LITERATURA CITADA

- Adams, D.J., 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150: 2029–2035.
- Abo-Elyousr, K.A., Abdel-Hafez, S.I., Abdel-Rahim, I.R. 2014. Isolation of *Trichoderma* and Evaluation of their Antagonistic Potential against *Alternaria porri*. *Journal of Phytopathology Early View* (<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/earlyview>).
- Amrutha, V.G., Eswara, R.N.P. 2014. Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia bataticola*, the causal agent of dry root rot of chickpea. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 5:195-196.
- Bara, M.T.F., Lima, A.L., Uloha, C.J., 2003. Purification and characterization of an a exo- $\beta$ -1, 3 glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Lett.* 219: 81–85.
- Enhamoun, N., Chet, I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *App. Environment Microbiology* 63: 2095- 2099.
- Bhale, U.N., Wagh, P.M., Rajkonda, J.N. 2013 Antagonistic confrontation of *Trichoderma* spp against fruit rot pathogens on Sapodilla (*Manilkara zapota* L.). *Journal of Yeast and Fungal Research* 4: 5-11.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248- 254.
- Bruce, A., Srinivasan, U., Staines, H., J., Highely, T. L. 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi. *International Biodet. & Biodeg.* 23: 337-353.
- Clavijo, G.Y., Cotes, A.M. 1998. Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* en tomate, mediante

- tratamientos de pregerminación controlada de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. Revista Colombiana de Biotecnología 1: 58-66.
- Christy, J. E., Tharmila, S., Niranjana, K. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato damping off. Archives of Applied Science Research 4 :1623-1627.
- El-Katatny, M.H., Gudelj, M., Robra, K.H., Elnaghy, M.A., Gubitz G.M. 2001. Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. Applied Microbiology and Biotechnology 56: 37-143.
- Escalante, E.Y.I., Osada, K.S., Escalante, E.J. 2011. Variabilidad Patogénica de *Phytophthora parasitica* Dastur en Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Revista Mexicana de Fitopatología. 19:84-89.
- Ghrisalberti, E. L., Sivacithamparam, K. 1999. Antifungal antibiotic produced by *Trichoderma* spp. Soil Biology & Biochemistry 23:1011-1020.
- González, I., Infante, D., Martínez, B., Arias, Y., Miranda, I. 2012. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* promisorias como agentes para el control biológico. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Biotecnología Aplicada 29:7-11.
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., 2010. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. I: Expresión de actividad quitinasa. Revista Protección Vegetal 25(1):58-63.
- Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. Phytopathology 93:344–348.
- Guigon-López, C., Guerrero-Prieto, V., Lanzuise, S., Lorito, M. 2013. Enzyme activity of extracellular protein induced in *Trichoderma asperellum* and *T. longibrachiatum* by



- substrates based on *Agaricus bisporus* and *Phymatotrichopsis omnivora*. Fungal Biology 30: 1-11.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal 24:115-128.
- Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadwey, R. M., Di Pietro, A.; Peterbaur, C., Tronsmo, A. 2003. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology 83: 313-318.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96: 190-194.
- Harman, G.E. 2010. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma* spp. T-22. Plant Disease 84:377-393.
- Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I., Orduz, S., 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. Agronomía Colombia 26(3):451-458.
- Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A., Woo, S.L., Harman, G.E. 1999. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucanases 1,3-b-glucosidase and N-acetyl b-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 84: 398-405.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193:265-275.
- Madi, L., Katan, T., Katan, J., Henis, Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. Phytopathology 87: 1054-1060.
- Marcello, C.M., Steindorff, A.S., Da Silva, S.P., Rod, N.S., Méndez, B. LA., Uloha, C.J. 2010. Expression analysis of the exo-beta-1-3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. Microbiology 165(1):75-81.

- Martinez, B., Reyes, Y., Infante, D., González, E., Baños, H., Cruz, A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Revista Protección Vegetal* 23(2):118-125.
- Michel-Aceves, A. C., Rebolledo-Domínguez, O. Lezama-Gutiérrez, R., Ochoa-Moreno, M. E., Mesina-Escamilla, J. C. Samuels, G. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por “Escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:154-160.
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O. Lezama Gutiérrez, R. 2004. Producción y actividad antibiótica del 6 pentyl-alfa-pyrone de *Trichoderma* spp. Sobre especies de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:14-21.
- Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R., Ariza-Flores, R. Barrios-Ayala, A. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum in vitro*. *Revista Chapingo, Serie Horticultura* 11:273-278.
- Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M. A., Solano-Pascacio, L. Y., Ariza-Flores. R., Barrios-Ayala, A. Lezama-Gutiérrez, A. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la “Escoba de Bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana Fitopatología* 27:18-26.
- Mihueli, Q., Whipps, J. M., Budge, S.P., Lynch, J. M. 1995. Production of inter-and intra-strain hybrids of *Trichoderma* spp. by protoplast fusion and evaluation of their biocontrol activity against soil-borne and foliar pathogens. *J. Phytopathology* 143: 91-97.
- Mohiddin, F.A., Khan, M. R., Khan, S. M., Bhat, B. H. 2010. Why *Trichoderma* is considered superhero (super fungus) against the evil parasites?. *Plant Pathology Journal* 9: 92-102.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153:375-380.

- Pezet, R., Pont, V., Tabacchi, R. 1999. Simple analysis of 6-pentylalpha-pyrone, a mayor antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytochemical Anal.* 10:285-288.
- Ramot, O., Cohen-Kupiec, R., Chet, I., 2000. Regulation of  $\beta$ -1, 3-glucanase by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. *Mycology Res.* 104:415–420.
- Reyes, Y., Martínez, B., Infante, D. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. *Revista Protección Vegetal* 23(2):112-117.
- Sanmartín, N.P., López, X., Pemberthy, M. P., Granada, S. D., Rueda, E.A. 2012. Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Revista Tumbaga* 7:29-49.
- Schoffemeer, E.A.M., Klis, F.M., Cornelissen, B.J.C. (1999). The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Biology* 27:275-282.
- Soler, A., De La Cruz, J., Llobell, A. 1999. Detection of  $\beta$ -1,6-glucanase isozymes from *Trichoderma* strains in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Journal of Microbiological Methods* 35:245-251.
- Soller, R.M.H., Cardoso, L.F.A., Ulhoa, C.J, Silva, R.D.N. 2010. Optimized microplate  $\beta$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods* 81 (1):6–10.
- Stefanova, N.M. 2007. Introducción y eficacia del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. en Cuba. *Fitosanidad* 11(3):75-79.
- Stefanova, N.M., Leyva, A., Larrignaga, L., Coronado, M.F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía* 16:509-516.
- Torres, D., Capote, T. 2004. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Ecosistemas* 13:2-6.

- Worasatit, N., K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, C. Rowland, 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research* 98:1357-1363.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo SL., Y Lorito M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10.
- Yedida, I., SrivastavaA, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil* 85:235-242.
- Yedida, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamoun, N., Kapulnik, Y., Chet, I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7343-7353.

## CAPITULO II

### PRODUCCIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DEL 6 PENTIL- $\alpha$ -PIRONA DE *Trichoderma* spp., SOBRE *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* AGENTES CAUSAL DE LA PATA PRIETA EN JAMAICA.

#### 2.1 RESUMEN

Se cuantificó el 6 pentil- $\alpha$ -pirona (6PAP) producido por 5 cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de suelo cultivado con jamaica, así como el efecto de antibiosis *in vitro* de cada cepa sobre el crecimiento del micelio, de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, agentes causales de la "Pata prieta" en jamaica. Todas las cepas, produjeron 6PAP desde 4.98 a 1615.75 mg kg<sup>-1</sup>; las de mayor producción fueron Ti14 y Ta9 de las especies *T. inhamatum* y *T. asperellum* respectivamente. El 6PAP producido por *Trichoderma* spp., inhibió el crecimiento del micelio de *P. parasitica* y *F. oxysporum* y hasta en un 47.6 y 42.6%, respectivamente. El 6PAP reactivo analítico, a concentraciones de 525 y 500 ppm inhibió totalmente el crecimiento del micelio. Los resultados obtenidos, sugieren que *Trichoderma* spp. por la actividad del 6PAP, tiene potencial como agente de control biológico de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* involucradas en la etiología de la "Pata prieta" en jamaica.

**Palabras clave:** Control biológico, 6 pentil- $\alpha$ -pirona (6PAP), "pata prieta", Guerrero.

**PRODUCTION AND ANTIBIOTIC ACTIVITY OF 6 PENTYL- $\alpha$ -PYRONE OF *Trichoderma* spp.  
AGAINST *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* CAUSER OF THE PATA PRIETA IN  
ROSELLE.**

**2.2 ABSTRACT**

The production of 6 pentyl- $\alpha$ -pyrona (6PAP) by 5 strains of *Trichoderma* spp. was quantified, as well as the *in vitro* antibiosis effect of each strain on mycelial growth of *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. All strains produced 6PAP ranging from 4.98 to 1615.75 mg kg<sup>-1</sup>, and being the most productive Ti14 and Ta9 of the species *T. inhamanthum* and *T. asperellum* respectively. The 6PAP produced by *Trichoderma* spp. had a 47.6 and 42.6% mycelial growth inhibition of *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. The analytic 6PAP reagent at 525 and 500 ppm showed a total mycelial growth inhibition for *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*, respectively. These results suggest that because of the activity of 6PAP, *Trichoderma* spp. Has potential as a biological control agent of the the etiology of "Pata prieta" in roselle.

**Key words:** Biological control, 6 pentyl- $\alpha$ -pyrone (6PAP), "pata prieta", Guerrero.

## 2.3 INTRODUCCION

El uso excesivo de fungicidas químicos han contribuido a la búsqueda de alternativas como la utilización de microorganismos antagonistas (Amrutha *et al.*, 2014). La habilidad de *Trichoderma* spp. para reducir los daños causados por agentes fitopatógenos, está relacionada con su capacidad de competencia, antibiosis, metabolitos secundarios, y al micoparasitismo (De Sousa *et al.*, 2008).

De acuerdo a Benítez *et al.* (2004), los metabolitos secundarios que produce *Trichoderma* son clasificados en tres categorías: a) peptabinoles, b) antibióticos polares y c) antibióticos volátiles. Los antibióticos volátiles son compuestos de bajo peso molecular y no polares que se liberan en una alta concentración en el suelo con efecto sobre la comunidad microbiana a larga distancia; por el contrario, un efecto a corta distancia (cerca de las hifas del hospedero), puede estar dado por antibióticos polares y por peptabinoles (Harman *et al.*, 2010). Entre mayor sea la cantidad de productos metabólicos, el poder antagónico se incrementa (Pezet *et al.*, 2000). Se han reportado diferentes compuestos volátiles producidos por *Trichoderma*, entre ellos: 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, tolueno, etilbenceno, p-xileno, m-xileno,  $\alpha$ -pineno, 3-etil-ciclopentanona, fenol y fenil etil alcohol y 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6PAP), entre otros, que tienen efectos antagónicos sobre los hongos fitopatógenos (Kredics *et al.*, 2003). El 6PAP es una lactona, utilizado como agente saborizante no tóxico que fue originalmente sintetizado para propósitos industriales antes de descubrirlo en la naturaleza, y dentro de estudios realizados como compuesto antimicrobiano, ha tenido buenos resultados en el control de *Pythium ultimum* Trow, *Sclerotium rolfsii* Sacc., y *Rhizoctonia solani* Kühn, entre otros (Kookana *et al.*, 2000; Kredics *et al.*, 2003; Michel-Aceves *et al.*, 2009). Entre los metabolitos volátiles que produce *Trichoderma* spp., el 6PAP es el más conocido y estudiado (Pezet *et al.*, 2000), debido a su potente actividad antifúngica (Rocha-Valadez *et al.*, 2006). La habilidad para producirlo es muy variada entre las diferentes especies, aún entre cepas de la misma

especie (Ruiz, 2011). Su toxicidad está relacionada con su habilidad hidrofóbica de adsorberse dentro de las membranas celulares, formando una capa hidrorepelente sobre la pared celular, que impide la absorción de agua por la célula del hongo (Ruocco *et al.*, 2009).

El 6PAP mostró ser promisorio *in vitro* y también *in vivo* en el control de muchos hongos en Nueva Zelanda, entre ellos *Armillaria*, *Botritis* y *Phytophthora* (Sanmartín *et al.*, 2012), es efectivo en tratamientos tópicos en el control de *B. cinerea* Pers., que causa pudrición en kiwi [*Actinidia deliciosa*(A.Chev.) C.F. Liang et A.R. Ferguson var.deliciosa] bajo condiciones de almacén (Poole y Whitmore, 1997; Poole *et al.*, 1998); además, aplicado en la superficie del suelo controla la enfermedad causada por *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu y Kimbrough en semillas y plántulas de lenteja (*Lens sculenta* Medik) (Dodd *et al.*, 2000). *In vitro*, el 6PAP producido por *T. harzianum* IMI 288012 con dosis de 0.3 mg ml<sup>-1</sup> en el medio de cultivo, redujo un 69.6% el crecimiento de *R. solani* y 31.7% el de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen después de 2 días. Con dosis de 0.45 mg ml<sup>-1</sup> se inhibe completamente la germinación de esporas; sin embargo, cuando se lavan las esporas, éstas germinan en 100% por lo que se pierde el efecto inhibitorio, indicando actividad fungistática y no fungicida (Sarhy-Bagnon *et al.*, 2000). Entre mayor sea la concentración del 6PAP producido por *Trichoderma* spp. se incrementa el porcentaje de inhibición *in vitro* de *Cylindrocladium floridanum* Sobers y C.P. Seymour, que causa pudriciones en plántulas de coníferas; con 50 ppm lo inhibe ligeramente, mientras que a 500 ppm lo hace totalmente, incluyendo la producción de microesclerocios (Serrano-Carreón *et al.*, 2002). Dosis de 220 ppm inhiben totalmente el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* (Stefanova y Sandoval, 1999) y la germinación de conidios (Poole *et al.*, 1998; Pezet *et al.* , 1999). Con base en lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron: Cuantificar la producción de 6 pentil- $\alpha$ -pirona en diferentes cepas de *Trichoderma* spp., y determinar su efecto antibiótico en el crecimiento del micelio.



## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1 Cepas en estudio

Se utilizaron cuatro cepas de *Trichoderma asperellum* (Ta6, Ta9, Ta10 y Ta11) y una cepa de *Trichoderma inhamatum* (Ti14) caracterizadas e identificadas molecularmente por Esparza (2009). Las cepas fitopatógenas, *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* agentes causales de la “Pata prieta” fueron proporcionadas por el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos, caracterizadas molecular y morfológicamente.

### 2.4.2 Inducción del 6PAP por cepas de *Trichoderma* spp. en medio sólido

En el laboratorio de Biotecnología del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, *Trichoderma asperellum* (cepas 6, 9, 10 y 11) y *Trichoderma inhamatum* (cepa 14) se subcultivaron en un medio papa-dextrosa-agua (PDA, Sigma) en placas Petri de 9 cm y se incubaron a temperatura ambiente en cultivo estático durante 5 días, momento en que se tomó el micelio para el desarrollo del ensayo.

Se preparó un medio sólido, según la metodología de Cooney *et al.*, (2001), para lo cual se utilizaron matraces de 250 ml a los cuales se les agregó 10.0 g de maíz molido (el grano entero se pasó por un molino Wiley con una malla de 1 mm), 3.0 ml de agua destilada y 5.0 ml de un suplemento formado por (1.0 g de extracto de levadura, 2.0 g de caseína hidrolizada, 1.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , y 15.0 g de glucosa  $\text{L}^{-1}$ ). El medio se esterilizó a 121°C por 20 min y posteriormente se dejó enfriar; se inocularon grupos de cuatro matraces con 1.0 ml de una suspensión de conidios ( $1 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) de 10 días de edad de cada una de las 5 cepas de *Trichoderma* spp. y se incubaron a 20°C, con 24 h de luz y 50% de humedad relativa durante 18 días. Para extraer el metabolito, una vez pasado el período de incubación, a cada matraz se le adicionó 50 ml de la mezcla metanol-agua (Aldrich,

Sheboygan, WI) en una proporción 85:15 (v/v), se mezcló en un homogenizador durante 2 min para deshacer los agregados y así se mantuvo homogenizando por 4 h; posteriormente, el contenido de cada matraz se filtró con papel Whatman GF/A de 9.0 cm de diámetro con una bomba de vacío. Luego, se vertió en embudo de separación en alícuotas de 4 ml y se les adicionó 2 ml de ciclohexano (Aldrich) y 10 mL de una solución salina al 10% (pH 6.5); se mezcló y se dejó en separación durante 12 h. La capa de ciclohexano, con el 6PAP se separó de la solución y se pasó a través de 1.5 g de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), para eliminar el agua y secarlo (Stefanova *et al.*, 2001).

### **2.4.3 Cuantificación del Compuesto volátil 6 PAP**

En el laboratorio de residuos químicos, del Instituto de Biotecnología de la UNAM Campus Cuernavaca se procedió a hacer la cuantificación del 6PAP, la cual se realizó en un cromatógrafo de gases (HP-6890 Plus, Hewlett-Packard, Abonadle, PA) con detector de ionización de flama (FID) (Pezet *et al.*, 2000) y una columna capilar no polar SPB-5 (Supelco, Bellefonte, PA), fase aglomerada de poli (5% difenil/95% dimetilsiloxanos) de 25 m de longitud, 0.2 mm de diámetro interior y una película de 0.33  $\mu\text{m}$ . Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron flujos de 45  $\text{mL min}^{-1}$  de helio; 450  $\text{mL min}^{-1}$  de aire y 40  $\text{mL min}^{-1}$  de hidrógeno, con 250°C de temperatura del inyector y del detector y 180°C de la columna, durante 6 min; posteriormente, la temperatura se fue elevando 30°C por min hasta alcanzar 230°C, con un flujo de 0.8  $\text{mL min}^{-1}$  de helio como gas de arrastre, 1  $\mu\text{L}$  fue el volumen de inyección y 8.67 min el tiempo de cada corrida. La producción de 6PAP se expresó en  $\text{mg kg}^{-1}$  de sustrato. En total, se generaron 5 tratamientos, que corresponden a las cepas de *Trichoderma* spp., en estudio, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de diferenciación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ) con el programa estadístico SAS (SAS, 2010).

#### **2.4.4 Antibiosis del 6PAP de *Trichoderma* spp., sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.**

Para evaluar el efecto antibiótico del 6PAP de cada una de las cepas *Trichoderma* spp., se indujo la producción del metabolito a través del medio de cultivo líquido propuesto por Pezet *et al.*, (2000), en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad se adicionaron 50 ml de medio con 3.5% de Czapek Dox Broth, 4.0% de glucosa y 0.5% de extracto de levadura; el medio se ajustó a un pH de 5.5 para luego esterilizarlo a 121°C por 20 min (la glucosa se esterilizó por separado). Posteriormente, se dejaron enfriar y se adicionó la glucosa antes de inocular con 1 ml de una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ , incubándose a 25°C en oscuridad, con 40% de humedad relativa, en un agitador rotatorio a 180 rpm durante 5 días. Después de la fermentación, la biomasa se pasó a través de papel filtro Whatman No. 2 y posteriormente el filtrado se centrifugó a 10 000 rpm por 30 min. El sobrenadante obtenido se esterilizó con filtro millipore 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Co., Bedford, MA), y 10 ml de este filtrado de cada una de las cepas se mezcló en proporción 1:1 (v/v) en PDA (5.9%) antes de solidificar. Cada caja Petri se inoculó con un disco de 5 mm de diámetro de PDA (3.9%) con micelio de colonias de 10 días en crecimiento activo de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, y se incubaron a 25°C, con un fotoperíodo de 12 h y 40% de humedad relativa durante 12 días. Como testigos se utilizaron cajas Petri con PDA y agua destilada estéril en lugar de filtrado. Se tuvieron 4 repeticiones de cada tratamiento de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente (Highley, 1997; Madi *et al.*, 1997). El diámetro de las colonias, expresado en mm se registró cada 2 días hasta 12 días después de la inoculación, tiempo en el cual el testigo llenó la superficie de la caja Petri. Los datos se expresaron en porcentaje de inhibición.

El efecto antibiótico del 6PAP del porcentaje de inhibición del micelio, se evaluó con los 5 tratamientos que corresponden a las cepas de *Trichoderma* spp. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones. Los datos en porcentaje fueron transformados para uniformizar las varianzas ( $\text{arc sen } \sqrt{\%}$ ); posteriormente se realizó el

análisis de varianza y las pruebas de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ) con el paquete estadístico SAS (SAS,2010).

#### **2.4.5 Efecto antibiótico del 6PAP, reactivo analítico.**

Además de evaluar el efecto antibiótico del 6PAP producido por las cepas de *Trichoderma*, se midió el mismo efecto con el reactivo analítico puro (Aldrich, Sheboygan, WI) sobre la inhibición del crecimiento del micelio, potencial reproductivo de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, esto para medir el efecto que tiene el 6PAP sobre los agentes causales de la "pata prieta". Se prepararon 25 concentraciones utilizando éter dietílico como solvente, desde 0 a 600 ppm, las cuales se incorporaron bajo condiciones asépticas al PDA al vaciar a cajas Petri antes de solidificar; se dejaron destapadas por 5 min a efecto de que se evaporara el solvente. A cada caja Petri, con su respectiva cantidad de 6PAP, se le colocó un disco de 5 mm de diámetro de PDA (3.9%) con micelio de colonias de 10 días de edad en crecimiento activo de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, y se incubaron a 25°C, con un fotoperíodo de 12 h y 40% de humedad relativa durante 12 días. Como testigos se utilizaron cajas Petri con PDA y éter con agua destilada en lugar del 6PAP. Se realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento. El diámetro de la colonia se midió cada 2 días. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de diferenciación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ) con el programa estadístico SAS (SAS,2010).

#### **2.4.6 Antibiosis del 6PAP de *Trichoderma* spp., sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.**

Para evaluar el efecto antibiótico del 6PAP de cada una de las cepas *Trichoderma* spp., se indujo la producción del metabolito a través del medio de cultivo líquido propuesto por Dumas *et al.* (1996). En matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad se adicionaron 50 ml de medio con 3.5% de Czapek Dox Broth, 4.0% de glucosa y 0.5% de extracto de levadura; el

medio se ajustó a un pH de 5.5 para luego esterilizarlo a 121°C por 20 min (la glucosa se esterilizó por separado). Posteriormente, se dejaron enfriar y se adicionó la glucosa antes de inocular con 1 ml de una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ , incubándose a 25°C en oscuridad, con 40% de humedad relativa, en un agitador rotatorio a 180 rpm durante 5 días. Después de la fermentación, la biomasa se pasó a través de papel filtro Whatman No. 2 y posteriormente el filtrado se centrifugó a 10 000 rpm por 30 min. El sobrenadante obtenido se esterilizó con filtro millipore 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Co., Bedford, MA), y 10 ml de este filtrado de cada una de las cepas se mezcló en proporción 1:1 (v/v) en PDA (5.9%) antes de solidificar.

Cada caja Petri se inoculó con un disco de 5 mm de diámetro de PDA (3.9%) con micelio de colonias de 10 días en crecimiento activo de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, y se incubaron a 25°C, con un fotoperíodo de 12 h y 40% de humedad relativa durante 12 días. Como testigos se utilizaron cajas Petri con PDA y agua destilada estéril en lugar de filtrado. Se tuvieron 4 repeticiones de cada tratamiento para *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* (Highley, 1997; Madi *et al.*, 1997). El diámetro de las colonias, expresado en mm se registró cada 2 días hasta 12 días después de la inoculación, tiempo en el cual el testigo llenó la superficie de la caja Petri. Los datos se expresaron en porcentaje de inhibición. El número de conidios se determinó en la cámara hematométrica de Neubauer (Lumycite, Propper, Manufacturing Co. Inc. Long Islan, NY). El efecto antibiótico del 6PAP se midió en la variable de porcentaje de inhibición del micelio. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones. Los datos en porcentaje fueron transformados para uniformizar las varianzas ( $\text{arc sen } \sqrt{\%}$ ); posteriormente se realizó el análisis de varianza y las pruebas de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ) con el paquete estadístico SAS (SAS, 2010).

## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSION

### 2.5.1 Producción del 6PAP por cepas de *Trichoderma* spp.

Todas las cepas de *Trichoderma* spp., produjeron el metabolito secundario 6PAP. La producción varió de 4.98 a 1615.75 mg kg<sup>-1</sup> (P < 0.01) (Cuadro 5). Las especies fueron capaces de producir 1615.75, 1283.75, 1067.54, 825.54, y 4.98 mg kg<sup>-1</sup> de 6PAP, Ta9, Ta6, Ti 14, Ta10 y Ta11, respectivamente.

La producción del 6PAP fue muy variable; la máxima cantidad fue de 1615.75 mg kg<sup>-1</sup> de sustrato por la especie *T. asperellum* (Ta9), lo cual coincide con lo reportado por Cooney *et al.* (2001), con rendimientos hasta de 2000 mg kg<sup>-1</sup> de sustrato; sin embargo, estas cantidades son superiores a las reportadas por Poole *et al.* (1999), quienes con la especie *T. viride* Pers.:Fr. y un medio de cultivo líquido suplementado con aceite de linaza, obtuvieron 376 mg l<sup>-1</sup> de sustrato; por su parte, Sarhy-Bagnon *et al.* (2000), utilizando *T. harzianum* produjeron 90 mg l<sup>-1</sup>. En general, los resultados en la producción del 6PAP fueron muy heterogéneos, aún en cepas de la misma especie. Esta tendencia concuerda con lo expresado por Michrina *et al.* (2005) y Essalmani *et al.* (2002), quienes indican que la producción de enzimas y otros metabolitos por cepas de *Trichoderma* es muy variable. Además, una cepa en particular puede producir diferentes metabolitos en diferentes estados de desarrollo dependiendo de las condiciones de cultivo (Dodd *et al.*, 2001). Los niveles de 6PAP se incrementan de 300 a 700% en presencia del fitopatógeno (Kredrics *et al.*, 2003). Entre mayor sea la producción se incrementa la efectividad antifúngica (De sousa *et al.*, 2008).

**Cuadro 5. Producción del 6 pentyl- $\alpha$ -pirona (6PAP) en cepas de *Trichoderma* spp.**

CEPA	ESPECIE	mg kg <sup>-1</sup>
Ta9	<i>T. inhamatum</i>	1615.75 a
Ta6	<i>T. asperellum</i>	1283.75 b
Ti14	<i>T. asperellum</i>	1067.54 bc*
Ta10	<i>T. asperellum</i>	825.54 c
Ta11	<i>T. asperellum</i>	4.98 d

\*Medias entre columnas seguidas con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

### 2.5.2 Antibiosis de *Trichoderma* spp., sobre *Phytophthora* parasitica y *Fusarium oxysporum*

Se inhibió el crecimiento del micelio de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* en un rango que varió de 20.60 a 43.35% y 8.02 a 36.22%, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Las especies produjeron mayor cantidad de 6PAP en los cultivos líquidos, presentaron el mayor efecto *in vitro* con valores de inhibición entre 43.35-36.17% y 36.22-32.37% para *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente (Cuadro 5 y 6).

Las especies *T. asperellum* (Ta9 y Ta6), se reportan entre las que inhibieron más el crecimiento vegetativo; en este sentido, Rucco *et al.* (2009), reportan porcentajes de inhibición superiores en *Cylindrocladium floridanum* por *T. harzianum* y *T. asperellum*; lo anterior indica que cada fitopatógeno responde de manera diferente al 6PAP y se requiere evaluar su sensibilidad en forma individual. Al respecto, Michrina *et al.* (2005), reportaron efecto antibiótico de *T. harzianum* sobre *Fusarium culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc. y *F. moniliforme* Sheld. por acción de antibióticos volátiles y no volátiles, con una inhibición del 46.98% del crecimiento radial del micelio. Sharhy- Bagnon *et al.* (2000) indican que las

especies *T. asperellum*, *T. pseudokoningii*, *T. koningii* y *T. polysporum* (Link) Rifai y *T. inhamatum*, presentaron diferentes grados de antagonismo *in vitro*, contra *F. oxysporum* Schlechtend.:Fr.f. sp. vasinfectum (Atk.) W.C. Zinder y H.N. Hans. en algodón (*Gossypium hirsutum* L.); donde, *T. polysporum* fue la más activa. Tanto *T. polysporum* y *T. viride* son las responsables de la alta reducción de la germinación de conidios. Reportes de Esalmani *et al.* (2002), indican que *T. harzianum* T88 y *T. atroviride* Karsten T95 por acción de metabolitos volátiles y no volátiles suprimen el crecimiento del micelio y la germinación de conidios de *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. Piricola Koganeza y Sakuma. La especie *T. asperellum* (Ta 11) que produjo cantidades mínimas de 6PAP, logro inhibir en un 20.6% el micelio de *Fusarium oxysporum*, tal parece que al haber poco 6PAP en el medio de cultivo, *Fusarium* no pudo aprovechar sus componentes como alimento. Al respecto, Stefanova y Sandoval (1999), reportan la presencia de productos biotransformados derivados de la interacción entre hongos, donde *Fusarium*, *Penicillium* y *Sclerotinia* son capaces de metabolizar el 6PAP en mezclas de isómeros monohidroxilados, y en algunos casos de fuerte oxidación hasta ácidos carboxílicos; estos compuestos pueden ser utilizados como nutrimento en el crecimiento de los hongos; sin embargo, no todos los aislados de *Fusarium* metabolizan eficientemente la molécula.

En otras investigaciones sobre el efecto antagonico del 6PAP sobre *Fusarium* spp. no se observa efecto antibiótico sobre el potencial reproductivo, particularmente en la producción de conidios, donde la mayoría de las cepas aumentaron significativamente la producción de esporas en ambas especies del fitopatógeno (Wilhite *et al.*, 1999; Michel-Aceves *et al.*, 2001; Rocha- Valadez *et al.*, 2006; Michel-Aceves *et al.*, 2009). Tal parece que dicho comportamiento es una forma de tratar de perpetuar la especie (Saran-Sundar *et al.*, 2013) . Se reporta que la presencia de 6PAP en el medio de cultivo reduce 80% la formación de deoxynivalenol (DON), micotoxina que produce *F. graminearum* Schwabe sobre granos de maíz; más aún, *F. subglutinans* también reduce en promedio 62% la formación de DON (Cooney *et al.*, 2001); esto demuestra que especies del mismo género son capaces de



comportarse diferentes ante un mismo estímulo. Resultados similares obtuvieron Vinale *et al.* (2008), donde reportan inhibición del crecimiento del micelio en *F. moniliforme* en un 89%. También reportes de Sanmartin *et al.* (2012), indican inhibición del 100% del crecimiento del micelio y formación de estructuras reproductivas en *Botrytis cinérea*.

**Cuadro 6. Efecto de la producción de 6PAP de cepas de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento del micelio de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.**

CEPA	ESPECIE	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN	
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>
Ta9	<i>T. asperellum</i>	43.35 a	36.22 a
Ta6	<i>T. asperellum</i>	36.17 b	32.37 ab*
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	32.87 c	28.02 c
Ta10	<i>T. asperellum</i>	24.62 d	16.30 d
Ta11	<i>T. asperellum</i>	20.60 e	8.02 d

\* Medias con la misma letra por columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

### 2.5.3 Efecto antibiótico del 6-pentil- $\alpha$ -pirona, reactivo analítico.

Se manifestó un efecto inhibitorio gradual por la actividad del 6PAP reactivo analítico sobre el crecimiento del micelio de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*. El efecto aumentó conforme se incrementó la concentración del antibiótico, con valores que oscilaron entre 5.0 y el 100.0% para *Fusarium oxysporum* ( $P < 0.05$ ), mientras que para *Phytophthora parasitica* ( $P < 0.01$ ), los valores de inhibición variaron entre 2.4 y 100.0% (Cuadro 6).

La menor inhibición de micelio para *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* fue a partir de 475 ppm, con 46.3 y 42.7%, respectivamente.

El efecto inhibitorio del 6PAP reactivo analítico fue gradual sobre el crecimiento del micelio para *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, presentándose un efecto

fungisida a partir de 525 y 500 ppm para *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente. Los antibióticos producidos por algunos aislados tienen efecto fungicida o fungistático según la concentración (Harman *et al.*, 2010); en el caso del 6PAP, su actividad es fungistática y no fungicida (Cooney *et al.*, 2000). Al respecto, Essalmani *et al.* (2002) observaron acción fungistática por metabolitos volátiles de *T. asperellum* sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. lentis Vasudeva y Srinivasan, la cual no es específica porque inhibe el micelio de otros hongos. Este fenómeno de antibiosis puede ser en parte el responsable de tener los niveles de enfermedad controlados. El 6PAP grado reactivo tiene efecto inhibitorio en *F. oxysporum*; sin embargo, en *F. subglutinans*, no se observa en forma consistente (Michel-Aceves *et al.*, 2004). Cooney *et al.* (2001), indican que especies del mismo género son capaces de comportarse diferentes ante un mismo estímulo. Al respecto, Sarhy- Bagnon *et al.* (2000) reportan que dosis de 300 ppm producidos por *T. harzianum* IMI 288012 reducen 69.6% el crecimiento de *R. solani* y 31.7% el de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici, mientras que dosis de 450 ppm inhiben completamente la germinación de esporas. Pool *et al.* (1999), indican que a mayor concentración de 6PAP se incrementa el porcentaje de inhibición *in vitro* de *C. floridanum* y cuando utilizaron concentraciones de 500 ppm se inhibió totalmente el crecimiento del micelio y el potencial reproductivo. Vinale *et al.* (2007), reportaron que para inhibir totalmente el crecimiento del micelio y la formación de estructuras reproductivas de *B. cinerea* se requieren 220 ppm de 6PAP. Las especies de *Trichoderma* evaluadas afectan *in vitro* por antibiosis a *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum* por lo que estas cepas por su producción de PAP son un recurso disponible para su evaluación bajo condiciones de invernadero y campo, como un agente de control biológico potencial de la enfermedad de la "Pata Prieta" en jamaica.

**Cuadro 7. Efecto del 6 pentyl- $\alpha$ -pyrona, reactivo analítico sobre el crecimiento del micelio de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.**

PPM	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN			
	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Phytophthora parasitica</i>	
600	100.00	a <sup>1</sup>	100.00	a
575	100.00	a	100.00	a
550	100.00	a	100.00	a
525	100.00	a	100.00	a
500	86.47	b	100.00	a
475	85.23	b	81.70	b
450	84.40	b	78.87	bc
425	80.70	b	74.80	bcde*
400	67.20	c	72.90	cdef*
375	68.83	c	71.98	defg*
350	66.80	c	68.30	efg*
325	66.80	c	66.27	fgh*
300	66.80	c	63.40	gh*
275	65.57	cd	58.57	h
250	62.27	cd	57.73	h
225	59.40	cd	47.57	i
200	59.40	cd	46.37	i
175	58.17	cde	43.87	ij
150	53.27	de	37.00	j
125	45.30	ef	24.37	k
100	35.20	f	12.60	l
075	18.33	g	8.53	l
050	5.97	h	3.67	m
025	5.03	h	2.43	m
Testigo	0.00	h	0.00	m

\*Medias entre columnas seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey < 0.05).

## 2.6 CONCLUSIONES

Todas las cepas de *Trichoderma* spp., produjeron el metabolito secundario 6PAP. La producción varió de 4.98 a 1615.75 mg/kg ( $P < 0.01$ ) (Cuadro 1). Las especies Ta9, Ta6, Ti 14, Ta10 y Ta11 fueron capaces de producir 1615.75, 1283.75, 1067.54, 825.54, y 4.98 mg kg<sup>-1</sup> de 6PAP, respectivamente.

El 6PAP producido por cepas de *Trichoderma* spp., mostró efecto de antibiosis sobre el crecimiento del micelio de *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, e inhibió hasta el 36.22% y 43.35%, respectivamente.

Las especies de *Trichoderma* evaluadas afectan *in vitro* por antibiosis a *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, por lo que son un recurso disponible para su evaluación bajo condiciones de invernadero y campo, como un agente de control biológico potencial de la enfermedad de la "Pata Prieta" en jamaica.

## LITERATURA CITADA

- Amrutha, V.G., Eswara, R.N.P. 2014 Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia bataticola*, the causal agent of dry root rot of chickpea. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 5:195-196.
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Cooney, J.M., Lauren, D.R., Jensen, D.J., Perry-Meyer, L.J. 1999. Effect of solid substrate, liquid supplement, and harvest time on 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6PAP) production by *Trichoderma* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:531-534.
- Cooney, J.M., Lauren, D.R. 2000. Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6PAP) by selected fungal isolates. *Journal of Natural Products* 62:681-683.
- Cooney, J.M., Lauren, D.R., Di Menna, M.E. 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:522-526.
- Cutler, H.G., Crumley, F.G., Cole, P.D. 2008. 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agr. Biol. Chem.* 50:2943–5
- De Sousa, R. A., Batista, F.S., Ferreira, L.S.G. 2008. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 712-717.
- Dodd, S.L., Hill, R.A., Stewart, A. 2000. Control of *Athelia rolfsii* disease on lentil seedlings using 6-Pentyl-alpha-pyrone. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1033-1034.

- Essalmani, H., Lahlou, H. 2002. *In vitro* antagonistic activity of some microorganisms towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis*. *Cryptogamie Mycologie* 23:221-234.
- Harman, G.E. 2010. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma* spp. T-22. *Plant Disease* 84:377-393.
- Kalyani, A., Prapulla, S.G., Karanth, N.G. 2000. Study on the production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone using two methods of fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 (5): 610-612.
- Kredics, L., Antal Z, Manczinger L, Szekeres A, Kevei F, Nagy E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology* 41: 37-42.
- Kookana, R.S., Simpson, B.W. 2000. Pesticide fate in farming systems: Research and monitoring. *Communications in Soil Science & Plant Analysis* 31: 1641-1659.
- Michrina, J., Michalikova, A., Rohacik, T., Kulichova, R. 2005. Antibiosis as a possible mechanism of antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium culmorum*. *Ochrana Rostlin* 31:177-184.
- Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R. 2004. Producción y actividad antibiótica del 6-pentil-a-pirona de *Trichoderma* spp. sobre especies de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22 (1): 14-21
- Pezet, R., Pont, V., Tabacchi, R. 2000. Simple analyses of pentyl-a-pyrone, a mayor antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytochemical Analyses* 10:285-288.
- Poole, P.R., Whitmore, K.J. 1999. Effects of topical postharvest applications of 6-Pentil-2-pyrone on properties of stored kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology* 12:229-237.
- Poole, P.R., Ward, B.G., Whitaker, G. 2001. The effects of topical treatment with 6-Pentil-2-pyrone and structural analogues on stem and postharvest rots in kiwifruit due to *Botrytis cinerea*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77:81-86.

- Rocha-Valadez, J.A., Estrada, M., Galindo, E., Serrano-Carreón, L. 2006. From shake flasks to stirred fermentors: Scale-up of an extractive fermentation process for 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone production by *Trichoderma harzianum* using volumetric power input. *Process Biochem.* 41 (6):1347-1352.
- Ruiz, R.A. 2011. Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum*-*Sclerotium rolfsii* sacc. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México. 162 p.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turra, D., Woo, S. L., Lorito, M. 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 291
- Sharhy-Bagnon, V., Lozano, P., Saucedo-Castañeda, G., Roussos, S. 2000. Production of 6-Pentil-alpha-pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochemistry* 36:103-109.
- Sanmartín, N.P., López, X., Pemberthy, M.P., Granada, S.D., Rueda, E.A. 2012. Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. *Revista Tumbaga* 7:29-49.
- Saran-Sundar, M., Vinodhkumar, T.Y., Ramanathan, G. 2013. Evaluation of antifungal activity of metabolites from *Trichoderma* species against fungal phytopathogens. *International Journal of Science Innovations and Discoveries* 3:528-538.
- Sarhy-Bagnon, V., Lozano, P., Saucedo, L., Castañeda, G., Roussos, S. 2000. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochem.* 36 (1-2):103-109.
- Serrano-Carreón, L., Balderas-Ruíz, K., Galindo, E. and Rito-Palomares, M. 2002. Production and biotransformation of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* in two-phase cultures systems. *Appl. Microbiol. Biotechnology* 58:170-174.

- Serrano-Carreón, L., Hathout, Y., Bensoussan, M., Belin, J.M. 2004. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esters. *Biotechnol. Lett.* 14 (11): 1019-1024.
- Stefanova, M., Sandoval, I. 1999. Efectividad de *Trichoderma* spp. en el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Boletín Técnico 2, CIDINISAV, La Habana, Cuba.*
- Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L. Coronado, F. 2001. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* sp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)* 16: 509-516.
- Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R., Valéro, J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37: 1–20.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10.
- Wilhite, S.E., Straney, D.C. 1999. Timing of gliotoxin biosynthesis in the fungal biological control agent *Gliocladium virens* (*Trichoderma virens*). *Applied Microbiology and Biotechnology* 45:513-518.



## CAPITULO III

### **CAPACIDAD ANTAGÓNICA, ANTIBIÓTICA Y MICOPARASITICA *in vitro* DE DIFERENTES AISLADOS NATIVOS DE *Trichoderma* spp. CONTRA *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, CAUSANTE DE LA PATA PRIETA DE LA JAMAICA.**

#### **3.1 RESUMEN**

Se evaluó la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en suelos del estado de Guerrero cultivados con Jamaica, sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, agentes causales de la enfermedad de la "pata prieta", mediante la técnica de cultivos duales. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad antagónica *in vitro* de *Trichoderma* spp., sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum* analizando las variables de: días al primer contacto entre hifas, zona de intersección, clasificación del antagonismo e interacción antagónico-patógeno. Se observó por medio de Microscopía Electrónica de Barrido el micoparasitismo que provocan la cepas de *Trichoderma* sobre estos agentes fitopatógenos de la jamaica.

Se empleó un experimento completamente al azar, resultando 10 tratamientos con cuatro repeticiones y sus testigos. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). En la evaluación antagónica, se observó fuerte competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis contra *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, siendo las cepas Ti14 (*T. inhamatum*) y Ta10 (*T. asperellum*) las de mejor comportamiento antagónico, respectivamente. Para los días a primer contacto se destacaron los aislamientos Ta10 y Ta9 sobre *P. parasitica*, que alcanzaron el grado I en la escala usada, donde el antagonista sobrepasó y creció sobre el patógeno cubriendo el 100% del medio de cultivo. Los restantes aislamientos de *Trichoderma* alcanzaron clase II de antagonismo. En cuanto al efecto antibiótico, todos los aislamientos

inhibieron el crecimiento micelial. Se observó enrollamiento del micelio de todas las especies de *Trichoderma* sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, por medio de Microscopia Electrónica de Barrido.

**Palabras clave:** Control biológico, micoparasitismo, "pata prieta", Guerrero.

***In vitro* MICOPARASITIC, ANTAGONIC AND ANTIBIOTIC CAPACITY OF DIFERENT NATIVES STRAINS OF *Trichoderma* spp. AGAINST *Phytophthora parasitica* Dastur CAUSER OF THE PATA PRIETA OF THE JAMAICA.**

**3.2 ABSTRACT**

Isolates natives strains of *Trichoderma* spp., in *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum* from soils cultivated with jamaica were obtained from Guerrero. The antagonistic capacity was evaluated using the technique of dual cultive, analyzing the variable of days at first contact between mycelium, intersection zone, antagonism class and pathogen-antagonic interaction. In the study was used a factorial experiment under a completely randomized design, 10 interactions treatments with four replicates and a control treatment were used. Analysis of variance and multiple mean comparison procedures using the Tukey test ( $\alpha=0.05$ ). In the antagonic evaluation strong competition for space and nutrients, micoparasitic activity and antibiosis, was observed. The objective of this study was to determine the antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. in *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. In this evaluation, competition for the substrate and the antibiotic effect were determined. All tested isolates effectively competed for substrate against *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*, within *Trichoderma* strains Ti14 (*T. inhamatum*) and Ta10 (*T. asperellum*), achieving grade I in the scale used, where the antagonist overgrew the pathogen covering 100% of the culture medium. The remaining isolates of *Trichoderma*, were classified in CLASS II of antagonism. As well as to the antibiotic effect, all isolates inhibited mycelial growth. All natives strais of *Trichoderma* spp. showed an effectiveness, and was proved in electronic microscopy technique, the mycelium of *Trichoderma* spp. enveloped mycelium of *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*.

**Key words:** Biological control, micoparasitism, "pata prieta", Guerrero.

### 3.3 INTRODUCCIÓN

El uso de organismos fúngos con capacidad antagónica contra fitopatógenos habitantes del suelo que causan enfermedades en las raíces, y cuello del tallo de las plantas (Wilson y Backman, 2008) se implementó de tal forma que la actividad antagónica del género *Trichoderma* ha sido motivo de estudio frente a diversos organismos fúngos fitopatógenos de importancia agrícola, principalmente de los géneros *Sclerotium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Fusarium* (Reyes *et al.*, 2007).

En *Trichoderma* se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos. Entre los principales están la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, los que tienen una acción directa sobre el hospedero (Lorenzo, 2001).

*Trichoderma* presenta mecanismos cuya acción biorreguladora es de forma indirecta; entre estos se pueden mencionar: a) los que inducen mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta para inducir la resistencia (Harman *et al.*, 2004), b) la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos, c) la desactivación de enzimas de los patógenos durante el proceso de infección y d) la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas. La diversidad de mecanismos empleados permite que sean colonizadores exitosos en sus hábitats, lo cual se refleja en la utilización eficiente de sustratos y en la liberación de metabolitos secundarios y enzimas (Schuster y Schmoll, 2010).

### 3.3.1 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

#### 3.3.1.1 Micoparasitismo

El micoparasitismo se define como una simbiosis antagónica entre un organismo sobre un hongo (Chet, 1990). Existen aspectos que no están totalmente esclarecidos ya que es un proceso complejo, Chet y Benhamou (1998), mencionan fases de inicio para activar sus mecanismos de acción, las cuales son: A) Reconocimiento: Se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos (Hernández-Cruz *et al.*, 2005) (Pérez, 2004; Chet e Inbar, 1994). B) Crecimiento quimiotrófico: El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico (Chet, 1990). En la etapa de localización del hospedante, *Trichoderma* puede detectarlo a distancia gracias a algunos estímulos de las hifas (gradiente de excretas químicas) que crecen en dirección al patógeno como respuesta (Elad y Chet, 1983). C) Adhesión y enrollamiento: Cuando la respuesta de reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios, se enrollan alrededor de estas, todo esto está mediado por procesos enzimáticos (Pérez, 2004). Según Elad y Chet (1983), la adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno. D) Actividad lítica: En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Haram *et al.*, 1996). En los puntos de contacto donde se produce la lisis y aparecen los orificios, penetra la hifa del micoparásito en las del hongo hospedante. E) Producción de compuestos antimicrobianos: En esta fase se activan la producción de metabolitos secundarios, de compuestos volátiles y no volátiles, así como, en algunos caso hormonas de crecimiento.

Las especies de *Trichoderma* tienen un elevado potencial parasítico, con una actividad metabólica muy particular, que les permite parasitar eficientemente las estructuras fúngicas (Sandoval y López, 2002). Desde el punto de vista práctico las enzimas se toman en cuenta como criterio en la selección de aislamientos (Elad *et al.*, 1983).

Recientemente, Harman (2009) y Vinale *et al.* (2008), informaron nuevos mecanismos con los cuales *Trichoderma* ejerce su acción como antagonista y colonizador de las raíces, como son: 1. Aceleración del desarrollo del sistema radicular que posibilita la tolerancia al estrés por parte de la planta. 2. Solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos. 3. Estimulación del crecimiento vegetal. 4. Inducción de resistencia. Estos actúan indirectamente sobre los patógenos, ya que su acción es impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta.

### **3.3.1.2 Antibiosis**

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos tanto volátiles como no volátiles que impiden la colonización de microorganismos (Vey *et al.*, 2001; Howell, 1993). *Trichoderma* produce gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991) entre estos, los antibióticos, los cuales son productos naturales capaces de inhibir el crecimiento microbial. La producción de antibióticos es a menudo correlacionado con la habilidad de biocontrol; se ha demostrado que la aplicación directa de compuestos antibióticos tiene similar efecto sobre el patógeno hospedero, que cuando se utiliza el organismo correspondiente.

La producción de metabolitos secundarios por *Trichoderma* spp. depende de la cepa; de acuerdo a Ghisalberti y Sivasithamparam (1991), estos fueron clasificados en tres categorías: a) Peptaiboles, los cuales son oligopéptidos lineales de 12 a 22 aminoácidos ricos en aminoisobutírico (Rebuffat *et al.*, 1989; Le Doan *et al.*, 1986) como las trichorzianinas. b) Antibióticos polares como ácido heptelídico y ácido koníngico, gliotoxina, gliovirina, viridiol y viridina. c) Antibióticos volátiles por ejemplo 6-pentil-pirona (6PAP), 6-pent-1-eni1- $\alpha$ -pirona,

koninginina A, cloroformo, 5-metil-2-etilfuran y muchos de los derivados de isocianidos, las cuales pertenecen a las pironas.

Las estructuras químicas de antibióticos de *Trichoderma*, sugieren dos mecanismos de acción diferentes: antibiosis con compuestos no volátiles y antibiosis con compuestos volátiles.

Por tal motivo, es importante el conocimiento de los tipos de antagonismo de hongos biocontroladores para implementar una buena estrategia en el desarrollo de una agricultura sostenible, ya que el uso de organismos antagónicos representa una alternativa viable en comparación con el uso tradicional de agroquímicos, mismos que se caracterizan por su elevada eficacia y rápido control, pero también por eliminar junto con los organismos patógenos a otros benéficos (De Waard *et al.*, 2003), además de que el uso intensivo de productos químicos puede resultar en la selección de cepas resistentes del patógeno (Harman, 2008). Por otra parte, en la actualidad; la tendencia de obtener productos orgánicos mediante el empleo de una agricultura sustentable y amistosa con el medio ambiente, ha llevado a que los productores, encuentren en el mercado agrícola orgánico una forma más remunerable de obtener ingresos. Por lo anterior, se requiere de un uso más extenso del control biológico y por ello es necesario la obtención de agentes biocontroladores más eficaces de los que existen actualmente, agentes de control biológico nativos que sean capaces de competir con el patógeno dentro de un mismo nicho ecológico; para esto es conveniente distinguir capacidades potenciales de dichos agentes y la medida en que las mismas se expresaran dentro de cada ecosistema. Por lo anterior los objetivos de esta investigación fueron: Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de cinco cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a los fitopatógenos *Phytophthora parasítica* y *Fusarium oxysporum* causante de la enfermedad “pata prieta” en el cultivo de la jamaica en Guerrero. Evaluar el micoparasitismo de las cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Phytophthora parasítica* y *Fusarium oxysporum* por medio de Microscopia Electrónica de Barrido.

### 3.4 MATERIALES Y METODOS

#### 3.4.1 Evaluación de la actividad antagónica *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma* spp., contra cepas de *Phytophthora parasítica* y *Fusarium oxysporum*.

Para las cepas obtenidas de las especies nativas de *Trichoderma* y de la cepa de *P. parasítica* y *F. oxysporum*, se empleó un experimento completamente al azar, resultando la confrontación de cepas de *P. parasítica* y *F. oxysporum*; con los cinco aislamientos nativos de *Trichoderma* spp., con un total de 10 interacciones, con cuatro repeticiones y sus testigos. Se tomó como unidad experimental una caja Petri. Los datos se sometieron a un análisis de varianza bajo el modelo del diseño experimental mencionado y una prueba de comparación múltiple de medias usando el método de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) con el paquete estadístico de SAS.

Para evaluar la actividad antagónica se empleó la técnica de cultivos apareados. Se utilizaron cajas Petri con medio de cultivo PDA y se depositó a 2 cm de el extremo de la caja y en condiciones asépticas, un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada cepa de *P. parasítica* y *F. oxysporum* con crecimiento activo. Dos días después, en forma equidistante se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada aislado de *Trichoderma* spp. con 10 días de crecimiento. En los testigos se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de *P. parasítica* y *F. oxysporum* con crecimiento activo. Una vez colocados ambos organismos fungosos en las cajas Petri, se incubaron a temperatura ambiente ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ) y se observaron cada 24 hrs para evaluar las variables consideradas, las cuales fueron: días al primer contacto entre hifas, zona de intersección, clasificación del antagonismo, capacidad de esporulación de las diferentes especies de *Trichoderma* sobre las cepas de *P. parasítica* y *F. oxysporum*, e interacción del organismo antagónico con el patógeno. A continuación se describe cada una de las variables y la forma en que se tomaron los datos.



### **3.4.2 Días al primer contacto entre hifas**

Consiste en conocer el momento en que sucede el primer contacto entre las puntas de hifas del organismo antagónico y el patógeno. Se realizaron revisiones en las 10 interacciones y sus repeticiones, cada 24 hrs, a partir del momento de la siembra de ambos microorganismos, con la finalidad de observar el primer contacto de hifas y recabar la información pertinente correspondiente.

### **3.4.3 Zona de intersección**

Después del primer contacto entre las hifas del antagónico con el patógeno, se observó si los aislados de *Trichoderma* spp., crecían o no sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum*, esto se realizó en las 10 interacciones y sus respectivas repeticiones. Al observar crecimiento micelial, se realizaron mediciones con una regla de plástico, en centímetros. Se midió la zona de traslape o zona de intersección de las colonias, desde la rodaja de agar de *Trichoderma* spp., hasta la punta final del micelio; registrando las mediciones cada 24 hrs, hasta que el testigo cubrió la superficie de la caja Petri.

### **3.4.4 Capacidad de esporulación de *Trichoderma* spp.**

Michel (2001), estimó visualmente la esporulación de aislamientos de *Trichoderma* spp., ubicando tres niveles de esporulación, los cuales fueron: abundante, cuando *Trichoderma* spp., cubría más del 50% de la caja petri, media, cuando cubría menos del 50% de la caja petri y escasa, cuando se observaba una esporulación cercana o menor al 10%; por lo que, en el presente trabajo, la esporulación de las diferentes especies de *Trichoderma* se midió con una regla de plástico en centímetros, estas mediciones se realizaron en las 10 interacciones con sus repeticiones durante el experimento, hasta que el testigo cubrió la superficie de la caja Petri. El tamaño de la caja Petri utilizada en este experimento fue de 10

cm de diámetro, por lo que, se estableció una regla de tres simple, teniendo de esta forma que por cada centímetro con esporulación, correspondía a 10% y así sucesivamente para las mediciones resultantes. La clasificación de la esporulación se designó por lo tanto en cuatro niveles, teniendo así: esporulación abundante (66 a 100%), esporulación media (33 a 65%), esporulación baja (2 a 32%) y esporulación nula (0%), según el grado de desarrollo de las colonias del agente antagonico.

### **3.4.5 Clasificación del antagonismo**

Cada tratamiento evaluado se ubicó de acuerdo a la clasificación de antagonismo de Bell, *et al.* (1982).

En donde:

- 1=*Trichoderma* spp., sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio.
- 2=*Trichoderma* spp., sobrecrece dos terceras partes de la superficie del medio.
- 3=*Trichoderma* spp., y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro.
- 4=El patógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por *Trichoderma* spp.
- 5=El patógeno sobrecrece completamente a *Trichoderma* spp., y cubre totalmente la superficie del medio.

Este análisis se realizó de forma visual en base a la escala mencionada, en todas las interacciones y sus repeticiones. Esta variable fue registrada cuando el testigo cubrió la superficie de la caja Petri.

### **3.4.6 Interacción de aislados de *Trichoderma* spp., sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum*.**

Al momento del contacto y durante el crecimiento del antagonista, pueden actuar diversos mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., los cuales pueden ser: competencia

por espacio y nutrientes, micoparasitismo, lisis de hifas y antibiosis. Estos mecanismos de acción no son excluyentes unos de otros. La competencia por espacio y nutrientes y la antibiosis se determinó de manera visual en las 10 interacciones y sus repeticiones, ya que se observó la presencia de esporulación de *Trichoderma* spp., sobrecrecimiento al patógeno, detención del crecimiento del patógeno y pigmentación al medio de cultivo; esta variable fue registrada cuando el testigo cubrió la superficie de la caja Petri. Para observar el micoparasitismo y la lisis de hifas del patógeno, en las 10 interacciones, se realizaron cultivos duales. Se utilizaron cajas Petri con medio de cultivo PDA y se depositó a 2 cm del extremo de la caja y en condiciones asépticas, un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada cepa de *P. parasitica* y *F. oxysporum* con crecimiento activo. Dos días después, en forma equidistante se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada aislado de *Trichoderma* spp. con 10 días de crecimiento. Se procedió a observar bajo la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido la actividad micoparasitica que ejercen las cepas de *Trichoderma* sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum*.

#### **3.4.6.1 Procesamiento de las muestras para observación al Microscopio Electrónico de Barrido**

El procesamiento de las muestras se hizo mediante la técnica de Bozzola y Russell (2001), como se describe a continuación, se cortaron fragmentos de agar con las interacciones de los diferentes aislamientos de 6 x 6 mm para observar las interacciones de los hongos dichas muestras se fijaron en glutaraldehído 2.5 % en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1M pH 7.2 durante 12 hr. Posteriormente se realizaron tres lavados seriados con amortiguador de fosfatos antes mencionado, cinco minutos en cada cambio. Los tejidos se deshidrataron en una serie de etanoles graduales (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y 90%, por 45 min en cada concentración y 20 minutos en etanol 100%, 100% tres veces) en cada cambio. Las muestras se desecaron en una secadora de punto crítico (Sandri-780A), se colocaron y orientaron sobre portamuestras usando una cinta doble adhesiva de carbón y se

recubrieron con oro durante 4 minutos en una ionizadora (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat).

Las muestras se observaron y fotografiaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM 6390) operando a 15 Kv.

### 3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.5.1 Evaluación de la actividad antagónica in vitro de diferentes cepas de *Trichoderma* spp., contra *P. parasitica* y *Fusarium oxysporum*

El tiempo en que los testigos cubrieron la superficie de la caja Petri fue de 8 días, durante este tiempo se realizaron las tomas de datos para las variables evaluadas.

#### 3.5.2 Contacto de hifas

En todos los tratamientos las hifas de ambos microorganismos hicieron contacto en promedio a los 4 días después de la siembra; se observó que los aislados de *P. parasitica* y *F. oxysporum* detuvieron su crecimiento al momento del contacto con el agente antagónico. Estos resultados concuerdan con lo observado por Esparza (2009), en pruebas in vitro donde observaron que el crecimiento de *P. parasitica* se detuvo al tener contacto inmediato con diferentes especies de *Trichoderma*.

Resultados similares mencionan Correa *et al.* (2007), con aislados de *T. harzianum*, *T. aureoviride* y *T. crassum* en confrontación dual contra *Sclerotium rolfsii*, ya que el crecimiento del fitopatógeno se detuvo por completo al momento del contacto; de la misma forma Ezziyyani *et al.* (2007), mencionan que el crecimiento *Phytophthora capsici* se detiene al contacto con las hifas de *T. harzianum* y que la detención del crecimiento del fitopatógeno se debe principalmente a la activación de los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. al

verse confrontado con un organismo patógeno específico. Dennis y Webster (1971), mencionan que algunos aislados de *Trichoderma* producen antibióticos no-volátiles que causan la inhibición del crecimiento de colonias de patógenos después del contacto con las hifas, aseveración que se ha respaldado por Sivakumar *et al.* (2000), quienes señalan que especies de *Trichoderma* producen varios metabolitos tóxicos los cuales están implicados en la detención del crecimiento del agente fitopatógeno.

### 3.5.3 Zona de intersección

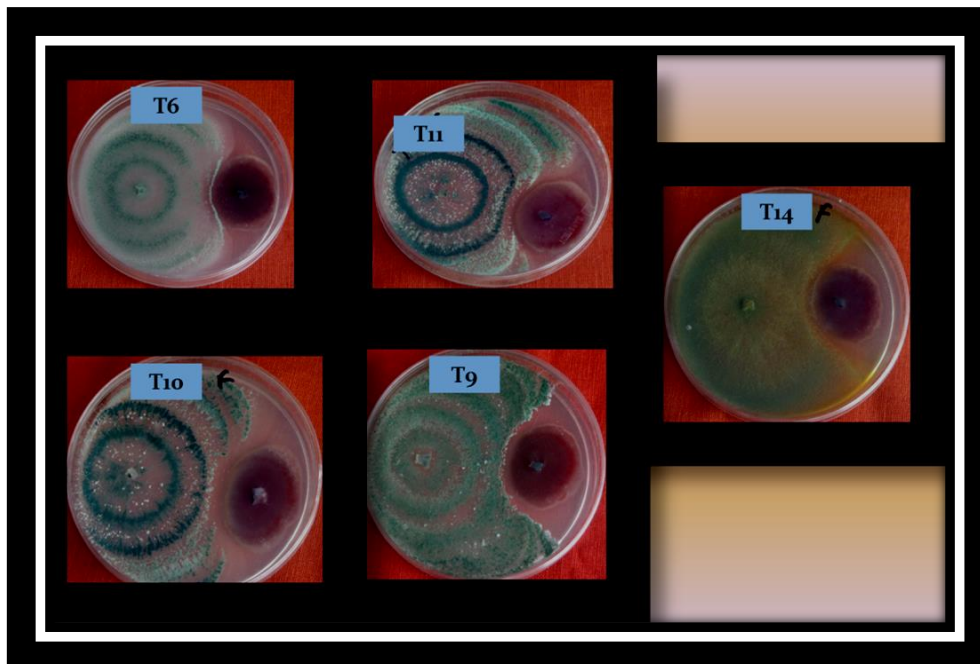
En las zonas de intersección, se tuvieron variaciones de distancia entre 0.0 a 4.9 cm. De esta forma, las confrontaciones que presentaron la mayor zona de intersección fueron: Ti14P (*T. inhamatum* cepa 14 - *P. parasitica*), Ta10P (*T. asperellum* cepa 10- *P. parasitica*), Ta9P (*T. asperellum* cepa 9 - *P. parasitica*) y Ta10F (*T. asperellum* cepa 10- *F. oxysporum*).

Mientras que la interacción Ta6F (*T. asperellum* cepa *F. oxysporum*), fue la que resultó con nula zona de intersección. Estos resultados están relacionados con el crecimiento de las cepas de *P. parasitica* y *F. oxysporum*. En relación a esta confrontación que no presentó zona de intersección, en las que solo se observaron las hifas de ambos hongos en contacto pero ninguno dominó sobre el otro; existen explicaciones como las que señalan Dennis y Webster (1971), que este fenómeno se debe a que algunas especies de *Trichoderma* son selectivas, lo que significa que ante determinados patógenos no ejercen su actividad antagónica, tal es el caso de *T. harzianum*, al ser confrontadas con patógenos específicos. Un ejemplo de lo anterior, son los resultados de Vera *et al.* (2005), quienes encontraron que *T. harzianum* no produjo ningún efecto antagónico sobre *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* y *Pythium myriotylum*, es decir, que ambos hongos crecieron sin mostrar una zona de intersección. Este fenómeno puede deberse también a lo experimentado por Rucco *et al.* (2009), estos autores, mencionan que existen compuestos volátiles llamados esporostáticos, como el acetaldehído, propionaldehído, n-butiraldehído, n-propanol, isobutanol, etilacetato, iso-butil acetato y la acetona. De la misma forma, Robinson y Garret (1969), señalan que

principalmente el acetaldehído es un compuesto volátil producido por *Trichoderma* spp., y que tiene la capacidad de detener el crecimiento de otros hongos, a este mecanismo se le conoce como fungistasis.

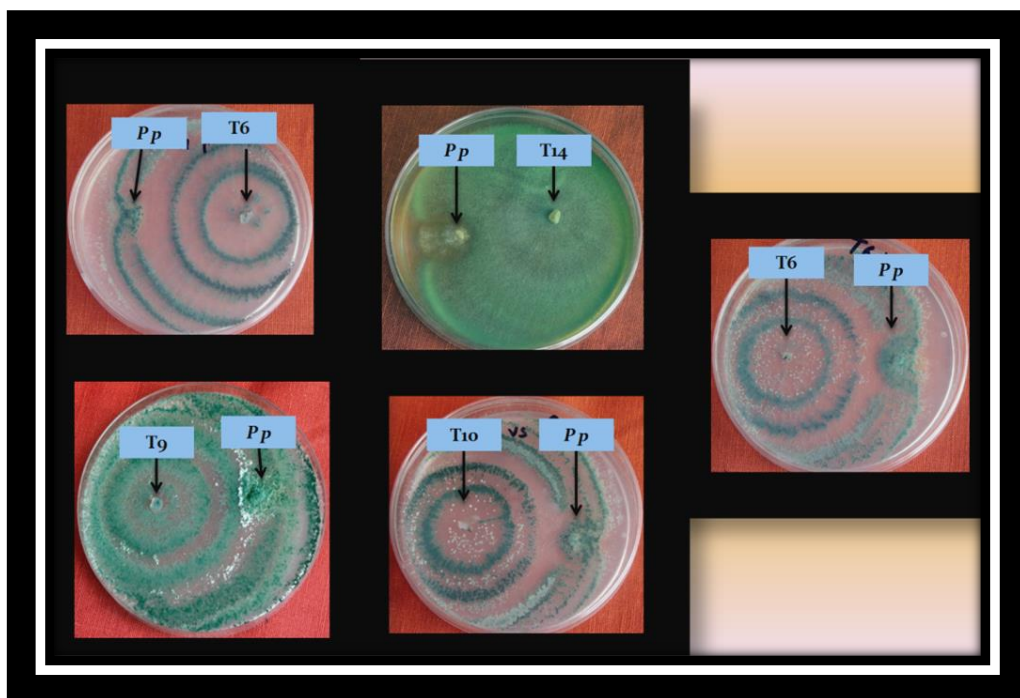
En las confrontaciones que presentaron zona de interacción, se encontró que, entre mayor fue la zona de intersección, mayor fue la agresividad de los aislados antagónicos y mayor el porcentaje de esporulación sobre las diferentes cepas de *P. parasitica*. Estos resultados son similares a lo observado por Ezziyyani *et al.* (2004), mencionan que la zona de intersección de *T. harzianum* frente al patógeno *P. capsici* aumenta a medida que transcurre el tiempo y que va acompañado de la destrucción del micelio del patógeno, indican también que algunas interacciones muestran una zona de inhibición progresiva. De manera similar Kexiang *et al.*, (2002) mencionan que a medida que aumenta el tiempo de incubación aumenta la zona de intersección y el nivel de inhibición de crecimiento del patógeno. En la Figura 4 y 5 se observa el crecimiento de las especies de *Trichoderma* spp. sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum* en relación con la zona de intersección por especie antagónica.

**Figura 4. Contacto de especies de *Trichoderma* vs *Fusarium oxysporum***



Autores como Papavizas y Lumsden (1980); Elad *et al.* (1982) y Lorito *et al.* (1993), señalan que las diferencias entre las zonas de intersección se deben a la producción de numerosos antibióticos de naturaleza volátil y no-volátil; mismos que se sintetizan al momento del contacto entre el antagonista y el fitopatógeno; de forma similar, Harman (2009), menciona que dichos antibióticos se pueden producir en mayor o en menor cantidad después del contacto entre hifas y que esto puede depender también de las especies tanto patógenas como antagonistas que se confronten, señalan además que la producción de enzimas como las glucanasas, quitinasas, proteasas y celulasas, degradadoras de paredes celulares, juegan un papel sumamente importante en el micoparasitismo. Esto nos indica que las 4 cepas que mostraron una mayor zona de intersección está correlacionado con una mayor actividad antagónica, por lo que, se ve reducida la colonia del patógeno y conforme transcurren los días, éste queda totalmente parasitado, ya que dentro de los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., ocurre el fenómeno del micoparasitismo.

**Figura 5. Contacto de especies de *Trichoderma* vs *Phytophthora parasitica*.**



### 3.5.4 Capacidad de esporulación de *Trichoderma* spp.

De manera general las 5 cepas de *Trichoderma* spp., evaluadas en la confrontación dual presentaron esporulación; siendo éstas la Ta9 frente a *P. parasítica* y la Ta10 frente a la cepa *F. oxysporum*, las que produjeron la mayor esporulación evidente. En la mayoría de los casos esporularon sobre el micelio de *P. parasítica* y *F. oxysporum*. Las diferencias en el porcentaje de esporulación indican también la agresividad de cada cepa de *Trichoderma* spp. sobre *P. parasítica*. Los resultados se muestran en los Cuadros 8 y 9

Ezziyyani *et al.* (2007), señalan que en pruebas de laboratorio el comportamiento de diferentes aislados de *Trichoderma* spp., retardan el crecimiento de *Phytophthora capsici* al colonizar y esporular sobre el patógeno, es decir, la inhibición del crecimiento del patógeno es gradual pero la colonización de *Trichoderma* spp., es rápida y marcada sobre todo por el proceso micoparasítico.

### 3.5.5 Clasificación del antagonismo

De acuerdo a la clasificación del antagonismo propuesta por Bell, *et al.* (1982), se ubicó a las 5 cepas de *Trichoderma* sobre *P. parasítica* en la clase 1. Para la confrontación dual entre las cepas de *Trichoderma* y *Fusarium oxysporum* todas obtuvieron la clase de antagonismo tipo 2.

No hubo cepas ubicadas en las clases 4 y 5. Lo anterior nos indicó que todas las cepas nativas de *Trichoderma* spp., poseen una capacidad de crecimiento rápido sobre el patógeno *P. parasítica* y *F. oxysporum*; característica que evidencia una fuerte actividad antagónica, esto nos muestra que, mientras mayor sea la superficie colonizada por el antagonista, se tendrá mayor dominio sobre el patógeno.

Correa *et al.* (2007), mencionan que *T. harzianum* clasificó como nivel 1 de antagonismo confrontándolo con *Sclerotium rolfsii*. Sin embargo, otros aislados de *T. harzianum* obtuvieron nivel 5 de antagonismo contra el mismo patógeno; esto sugiere que diferentes aislados de la misma especie de *Trichoderma* spp., pueden demostrar comportamientos



distintos frente a un mismo organismo patogénico, resultados que pueden atribuirse a la selectividad de *Trichoderma* spp., en relación a la mayor o menor producción de enzimas degradadoras de paredes celulares estrechamente relacionado con la capacidad micoparasítica y a la producción de compuestos antibióticos y compuestos fungistáticos; mecanismos de acción que ejerce este organismo antagónico al interactuar con un organismo patógeno.

### **3.5.6 Interacción de aislados de *Trichoderma* spp., sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum***

En las confrontaciones duales se logró observar como principal mecanismo de acción de *Trichoderma* spp., a la competencia por espacio y nutrientes y el micoparasitismo.

Las cepas que evidenciaron notablemente dichos eventos fueron: la Ta10 (*T. asperellum*), y Ta9 (*T. aperellum*), Ti14 (*T. inhamatum*), mismas que también indujeron lisis de hifas del patógeno y antibiosis en la mayoría de los tratamientos, además de pigmentación del medio de cultivo al momento del contacto de las hifas de ambos microorganismos, que se observó como un halo amarillo en la periferia del crecimiento del patógeno; como en las cepas T9 (*T. asperellum*) y T6 (*T. asperellum*); hasta la coloración rojiza del medio, como en el caso de la cepa T11 (*T. asperellum*). Estas observaciones pueden indicar la presencia de antibióticos difusibles al medio, ya que también se observó una disminución del crecimiento *P. parasitica*.

Vera *et al.* (2005), mencionan que *T. harzianum* formó una banda color amarilla-crema lo que significó cierto grado de antagonismo con el patógeno *Sclerotium cepivorum* y observó una invasión completa e inhibición de la formación de esclerocios. Los resultados obtenidos en esta evaluación demostraron una incompatibilidad con las cepas de *P. parasitica*; por lo que se evidenció una pigmentación en la misma especie de *Trichoderma* spp., en la mayoría de las confrontaciones con *P. parasitica*. Las observaciones para cada aislado de *P. parasitica* confrontado con las cepas de *Trichoderma* spp. se muestran en los Cuadros 7 y 8.

Para el caso de las cepas de *Trichoderma* confrontadas con *Fusarium oxysporum* no se presenta ninguna coloración del medio, pero se puede observar en la figura 6 como se delimita completamente el crecimiento de este hongo.

### **3.5.7 Inhibición de *P. parasitica* y *F. oxysporum* por *Trichoderma* spp.**

Los resultados de inhibición para las cinco especies de *Trichoderma* resultaron positivos lo cual coinciden con lo observado por Harman (2008) y Ghisalberti y Sivasithamparam (1991), quienes mencionan que especies de *Trichoderma* producen sustancias antifúngicas que actúan inhibiendo el crecimiento de algunos microorganismos.

Bruce (2000) reporta que las especies de *Trichoderma*, producen compuestos orgánicos volátiles; mismos que inducen fungistasis y efectos fungicidas contra diversos microorganismos; señala que algunos compuestos volátiles pueden identificarse como: 2 propanona, 2-metyl-1-butanol, heptanol, octanol y decanol y 6PAP.

Con respecto a lo anterior Arias *et al.* (2006), mencionan que las diferencias en el porcentaje de inhibición entre cepas de la misma especie de *Trichoderma*, se debe entre otras características, a su mayor o menor capacidad de producir enzimas específicas que degradan la pared celular del organismo patógeno. De esta misma forma Lorito *et al.* (1994), y Haran *et al.* (1995), mencionan que las principales enzimas que se producen son quitinasas, glucanasas y enzimas hidrolíticas, mismas que degradan la pared celular de hongos fitopatógenos y que, entre mayor es la cantidad producida, mayor es la capacidad de inhibir el crecimiento del micelio del patógeno. De la misma forma, Dennis y Webster (1971), mencionan que en mismas especies de *Trichoderma* demuestran diferente potencial antagónico; lo que significa que difieren en la producción de metabolitos difusibles al medio de cultivo y que poseen la capacidad de producir distintos compuestos que ejerzan un papel antagónico con determinado patógeno.

Barakat *et al.* (2007), señalan que en la interacción *T. harzianum* y *Rhizoctonia solani* existen diferencias significativas en la inhibición del crecimiento miceliar del patógeno entre

mismas especies, y que este evento puede ocurrir a las variaciones de la temperatura y su habilidad antagonista puede ser altamente variable; ya que solo el 11.5% de 39 aislados de *Trichoderma* spp., fueron efectivos en el control de *R. solani*.

Arias *et al.* (2006), realizaron pruebas de confrontación entre el patógeno *Phytophthora nicotianae* y el antagonista *T. harzianum*, mismas que mostraron un 8.3% de inhibición del patógeno, sin embargo en pruebas de producción de metabolitos difusibles al medio, esta misma interacción resultó en un 95% de inhibición del patógeno.

Kundu y Chatterjee (2003), publicaron que en pruebas de producción de metabolitos volátiles, *T. harzianum*, *T. viride* y *T. lignorum* inhibieron el crecimiento del patógeno *Polyporus sanguineus* en 67.7, 61.1 y 64.4% respectivamente y que en pruebas de producción de metabolitos no-volátiles se obtuvo un 100% en la inhibición del crecimiento.

Por otro lado Michel *et al.* (2001), mencionan que *T. virens* y *T. harzianum* mostraron, en pruebas *in vitro*, una inhibición del crecimiento contra *Fusarium oxysporum* y *Fusarium subglutinans* arriba del 60% y que dichas cepas se consideraron como agentes potenciales de control biológico de los causantes de la escoba de bruja en mango.

Los resultados obtenidos para la especie *T. asperellum* que corresponde a la cepa Ta9, mostró un 95% de inhibición del crecimiento sobre *P. parasitica*, considerado como un alto porcentaje, que está relacionado con una importante producción de compuestos antifúngicos, mismos que están reportados para esta especie enzimas como las quitinasas que funcionan como degradadoras de paredes celulares (Haran *et al.*, 1995)

La especie *T. asperellum* que corresponde a la cepa Ta10, mostró un 89% de inhibición del crecimiento sobre los aislados de *F. oxysporum* Ghisalberti y Sivasithamparam (1991) mencionan que esta especie antagonista produce compuestos como el trichodermin, trichodermol, paracelsin a-d, trichobrachim y T-2 toxin, entre otros metabolitos volátiles con actividad antifúngica a los cuales se les atribuye los resultados observados en esta interacción.

Michel *et al.* (2008), obtuvieron 20 aislados de *Trichoderma* spp., de los cuales se identificaron tres especies: *T. harzianum*, *T. longibrachiatum* y *T. koningii*, todos los aislados de *Trichoderma* inhibieron el crecimiento del micelio de *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans*, los valores fluctuaron significativamente entre 38.8% a 81.3% y 16.3% a 85.5%, respectivamente; y en este caso, de los 20 aislados evaluados, al menos 10 inhibieron el crecimiento de ambos hongos en un 65%.

En el caso de *T. inhamatum* (cepa Ti14) mostró una actividad sobresalientes en las pruebas de antagonismo. Esta especie ha sido poco estudiada, sin embargo, en esta investigación ha tenido grandes resultados, esto nos indica que para que un agente de control biológico sea eficaz y efectivo debe conjuntar características esenciales, tales como un alto nivel de competencia por espacio y nutrientes, alto micoparasitismo, lo cual está estrechamente relacionado con la producción de enzimas degradadoras de paredes celulares, una fuerte actividad antibiótica, así como producción de sustancias que induzcan fungistasis; de esta forma nos indica que esta especie tiene grandes cualidades como agente de control biológico, lo cual concuerda con Monte (2001), donde se obtuvieron buenos resultados de *T. inhamatum* en la extracción de enzimas hidrolíticas.

Con base en los resultados obtenidos en ambas pruebas, se identificaron tres cepas como potenciales organismos biocontroladores del agente causal de la pata prieta de la jamaica, las cuales corresponden a Ta9, Ta10, (*T. asperellum*) y Ti14 (*T. inhamatum*); considerando el principio que menciona que, para que un agente de control biológico tenga éxito, deben considerarse diferentes factores, tales como, las condiciones climáticas y el hábitat, los cuales deben ser adecuados para su crecimiento y para que invadan o afecten a los fitopatógenos que se desea controlar (Andrews, 1992).

De la misma forma Watanabe *et al.* (2005), mencionan que el principal problema en la efectividad del control biológico de fitopatógenos es que los organismos empleados, no están adaptados a las condiciones ambientales locales donde serán aplicados; es decir, que las condiciones térmicas deben ser compatibles con las del patógeno de dicha región, ya que

la producción enzimática está influenciada por la temperatura del ambiente, por lo tanto, los organismos nativos que poseen esta ventaja, junto con otros caracteres fisiológicos, podrán manifestar al máximo su potencial antagónico contra los fitopatógenos más comunes en determinadas regiones.

Sin embargo, De Sousa *et al.* (2008), menciona que la selección previa del antagonista en medio de cultivo duales y pruebas de metabolitos no volátiles es útil pero no garantiza el buen comportamiento de estas cepas en el invernadero y campo; por lo tanto, es necesario distinguir entre los metabolitos volátiles obtenidos en condiciones controladas de laboratorio y aquellos producidos en campo, los resultados *in vitro* solo indican capacidades potenciales, y la medida en que las mismas se expresarán dentro de cada ecosistema estará en función del balance entre la producción y la pérdida de los metabolitos, así como de la sensibilidad de los microorganismos.

**Cuadro 8. Contacto, sobrecrecimiento y esporulación de especies de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum*.**

CEPA	ESPECIE	Días al primer contacto	Inhibición	Esporulación		Clase de antagonismo <sup>1</sup>
				<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	5	+	+	-	2
Ta10	<i>T. asperellum</i>	4	+	+	-	2
Ta9	<i>T. asperellum</i>	4	+	+	-	2
Ta6	<i>T. asperellum</i>	5	+	+	-	2
Ta11	<i>T. asperellum</i>	5	+	+	-	2

<sup>1</sup>Clases de Antagonismo de Bell *et al.*, 1982: 1= *Trichoderma* sobrecrece al patógeno, 2= *Trichoderma* sobrecrece 2/3 partes del medio, 3= Ningún organismo es dominante

**Cuadro 9. Contacto, sobrecrecimiento y esporulación de especies de *Trichoderma* sobre *Phytophthora parasitica*.**

CEPA	ESPECIE	Días al primer contacto	Inhibición	Esporulación		Clase de antagonismo <sup>1</sup>
				<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Phytophthora parasitica</i>	
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	3	+	+	-	1
Ta10	<i>T. asperellum</i>	4	+	+	-	1
Ta9	<i>T. asperellum</i>	3	+	+	-	1
Ta6	<i>T. asperellum</i>	4	+	+	-	1
Ta11	<i>T. asperellum</i>	4	+	+	-	1

<sup>1</sup>Clases de Antagonismo de Bell *et al.*, 1982: 1= *Trichoderma* sobrecrece al patógeno, 2= *Trichoderma* sobrecrece 2/3 partes del medio, 3= Ningún organismo es dominante

### 3.5.8. Actividad micoparasitica observada bajo la tecnica de MEB

La actividad micoparasítica de las cepas de *Trichoderma* spp., sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum* se determinó mediante las observaciones al microscopio electrónico de las preparaciones al quinto día de contacto entre las hifas.

En la mayoría de los tratamientos fue visible el enrollamiento que hace la hifa de *Trichoderma*, sobre las hifas de *P. parasitica* y *F. oxysporum*, excepto en la cepas, Ti14, para ambos organismos fitopatógenos. El orificio de penetración se observó en la cepa Ta10 (*T. asperellum*) sobre *P. parasitica*, lo cual se observa en la figura 6.

Esto resultados son similares a los reportados por Michel-Aceves *et al.*, (2001), Benhamou y Chet (1997), quienes muestran evidencias al microscopio electrónico del enrollamiento de *Trichoderma* spp., en hifas de varios fitopatógenos, entre ellos *R. solani*, *S.*

*rolfsii*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker, *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*, entre otros.

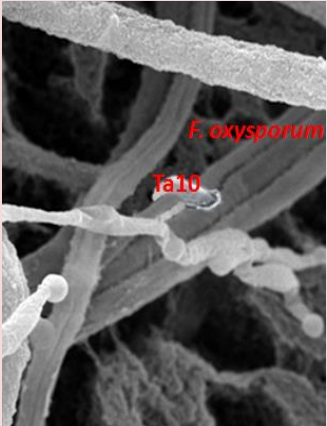
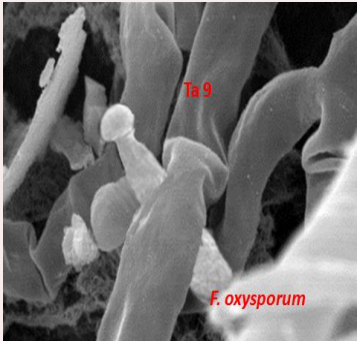
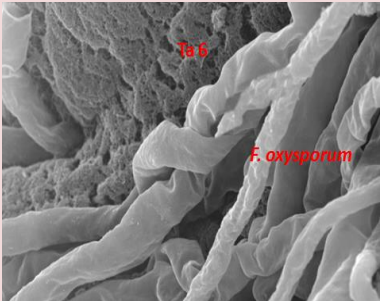
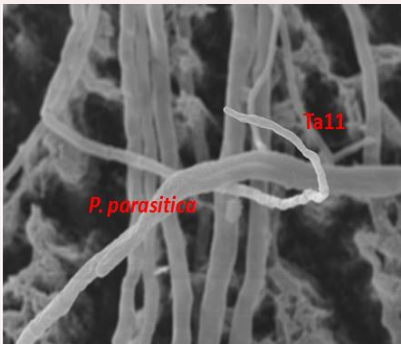
Se observó la penetración en hifas de *F. oxysporum* por Ta10 y en *P. parasitica* por Ta9 , reportes similares se han realizado sobre otros hongos fitopatógenos (Dennis y Webster, 1971, Ghisalberti, *et al.*, 1990; Howell, 2003; Harman, 2004), inclusive, penetración asociada a alteraciones en la pared celular por las enzimas y producción de sustancias antifungicas que juegan un papel importante en la desintegración de la pared celular (Michel-Aceves *et al.*, 2001).

En las cepas Tí14 y Ta 11 no se mostraron señales de penetración; se han realizado reportes similares sobre otros hongos fitopatógenos (Elad *et al.*, 1983; Ezziyyani *et al.*, 2004), aun cuando hubo antagonismo no se observó penetración (Arias *et al.*, 2006).

Asimismo, Bruce *et al.* (2000), no

encontró evidencia de penetración de *F. moniliforme* a pesar de las alteraciones morfológicas observadas. También, fue evidente la presencia de orificios en el micelio de *P. parasitica* con las cepa Ta10.

**Figura 6. Micoparasitismo de cepas de *Trichoderma* sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum*.**

CEPA	Actividad micoparasitica	INTERACCIÓN	IMAGEN POR MEB
Ta10	Orificios	<i>T. asperellum</i> vs <i>Fusarium oxysporum</i>	
Ta9	Penetración del micelio	<i>T. asperellum</i> vs <i>F. oxysporum</i>	
Ta6	Enrollamiento	<i>T. asperellum</i> vs <i>F. oxysporum</i>	
Ta11	Enrollamiento	<i>T. asperellum</i> vs <i>P. parasitica</i>	



### 3.6 CONCLUSIONES

Las cepas Ta10 (*T. asperellum*) y la Ta9 (*T. asperellum*) mostraron un comportamiento similar en el micoparasitismo sobre *P. Parasitica*, Ta9 (*T. asperellum*) y Ti14 (*T. inhamathum*) para *F. oxysporum*, por lo que se consideran como las de mayor potencial biocontrolador contra el causante de la pata prieta de la jamaica.

En todas las cepas se observó el enrollamiento que hacen las hifas de las cepas de *Trichoderma* spp., sobre las hifas de *P. parasitica* y *F. oxysporum*.

## LITERATURA CITADA

- Andrews, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30:603-635.
- Arias, M., Herrera, R., Besoain, X., Pérez, L. M., Montealegre, J. 2006. Evaluación *in vitro* de mutantes de cepas de *Trichoderma* para el control de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora nicotianae* en tomate. *Boletín Micológico* 21:71-75.
- Baker, K.F., Cook, R. J. 1974. Biological control of plant pathogen s. First edition. CRS Press. Freeman, San Francisco, CA, USA. 62 p.
- Baker, R. 1988. *Trichoderma* spp. as a plant growth regulators. *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 7:97-106.
- Barakat, R.M., Al-Mahareeq, F., Ali-Shtayeh M.S., Al-Masril, M. 2007. Biological control of *Rhizoctonia solani* by indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine. *Hebron university research journal* 1 (3): 1-15.
- Bell, D. K., Wells, H.D., Markham, C.R. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379-382.
- Bettucci, L.S., Lupos, S. Silvas. 1998. Growth control of wood rotting fungi by non volatile metabolites from *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Cryptogamic Mycological* 9 (2): 157-165.
- Bruce, A., Austin, W.J., King, B. 1984. Control of growth of *Lentinus lepideus* by volatiles from *Trichoderma* spp. *Transactions of the British Mycological Society* 82:423-428.
- Bruce, A., Wheatley, R.E., Humphris, S.N., Huckelt, C.A., Florence M.E.J. 2000. Production on volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effects on selected wood decay fungi. *Holzforschung* 54: 481-486.

- Chet, I., Harman, G.E., Baker, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology* 7:29-38.
- Chet, I., J. Inbar. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry Biotechnology* 48:37-43.
- Corréa, S.M., Melio, Z.R. Avila, L. M. Braúna, R.R. Papua, D. Gomes. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 11 (1): 3-9.
- Claydon, N., Allan, M., Hanson, J.R., Avent, A.G. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the British Mycological Society* 88: 503-513.
- Cooney, J.M., Laurent, D.R., Perry-Meyer, L.J. 1997. A novel tubular bioassay for measuring the production of antagonistic chemicals produced at the fungal/pathogen interface. *Letters in Applied Microbiology* 24:460-462.
- Cutler, H.G., Cox, R.H., Crumley, F.G., Cole, P.D. 1991. 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agricultural and Biological Chemistry* 50:2943-2945
- Dal Bello, G. M., Monaco, C. I. y Chavez, A. R. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Revista Iberoamericana de Micología* 14:131-134.
- De Waard, M.A., Georgopoulos, S.G., Hollomon, D.W., Ishii, I., Leroux, P., Ragsdale, N.N., Schwinn, F.J. 1993. Chemical Control of plant disease: Problems and prospects. *Annual Review Phytopathology* 31:403-421.
- Demain, A.L., Fang, A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology* 69:1-39.
- Dennis, C., Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57: 41-48.

- De Sousa, R.A., Batista, F.S., Ferreira, L.S.G. 2008. Production of 6-pentyl--pyrone by *Trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:712-717.
- Díaz, J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Tesis de Licenciatura. Universidad Agraria de La Habana, Cuba.
- Díaz, P.C., Castro J. L. 1977. Estudios sobre el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. *Agronomía Tropical* 27:539-547.
- Ezziyyani, M. Pérez-Sanchez, C., Requena, M.E., Sid Ahmed, A., Candela M.E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
- Ezziyyani, M., Requena, M.E., Candela, M.E. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología*. 27:143-153
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., Egea-Gilabert, C. y Candela, M.E. 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Phytopathology* 155:342-349.
- Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J., Dewan, M.M., Sivasithamparam, K. 1990. Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant Soil* 121:287-291.
- Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology Biochemistry* 11 (23):1011-1020.
- Grech, N.M. 1990. Fungicide resistance in plant pathogenic fungi: the problems and ways to cope. *California Grow* 14(4): 36-37.
- González S., A. Puertas A., M. Fonseca F, E. Suárez S., Blaya G. 1999. Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. aislada de un suelo de la provincia de Granma, Cuba frente a *Alternaria solani*. *Revista Facultad Agronomía (LUZ)* 16:167-173.

- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., Chet, I. 1995. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. Mycological Research 99:441-446.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T- 22. Plant Disease 84:377-393.
- Harman, G. E., Howell, C. R. Viterbo, A.; Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic avirulent plant symbionts. Nature Reviews 2:43-56.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant disease 87:4-10.
- Hill, R.A., Cutler, H.G., Parker, S.R. 1999. *Trichoderma* and metabolites as control agents for microbial plant diseases. The Patent Cooperation Treaty, International Patent Application WO 95 20,879. Chemical Abstracts 123:220823.
- Howell, C.R. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (Eds). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, biological control and commercial application. Taylor and Francis Ltd.. London. U. K. pp 173-183.
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease Journal 87: 4-10.
- Howell, C.R., Stipanovic, R.D., Lumsden, R.D. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. Biocontrol Science Technology 3:435-441.
- James, J.R., Tweedy, B.G., Newby, L.C. 1993. Efforts by industry to improve the environmental safety of pesticides. Annual Review Phytopathology 31:423-439.
- Kexiang, G.I., Xiaoguang, C. Ri., Yonghong, L., Suuliang, W. 2002. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. Piricola, the cause of apple ring rot. Phytopathology 150:271-276.

- Nemcovic, M., Jakubikova, L., Viden, I. Arkas, V. 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. FEMS Microbiology Letters 284: 231-236.
- Michel-Aceves, A.C., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R., Ochoa-Moreno, Ma. E., Mesina-Escamilla, J.C., Samuels, G. J. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por Escoba de bruja y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista mexicana de fitopatología 19 (2):154-160.
- Michel-Aceves, A.C., Otero-Sánchez, M.A., Martínez-Rojero, R.D.; Ariza-Flores, R. Barrios-Ayala, A., Rebolledo-Martínez, A. 2008. Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Avances en Investigación Agropecuaria 12(3):55-68.
- Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma* between biotechnology and microbial ecology. International Microbiology 14:1-4.
- Ortega, G.J.G. 2010. Diagnóstico de hongos fitopatógenos de jitomate y efecto de *Trichoderma asperellum* Tc74 sobre *Fusarium* spp. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México. 82 p.
- Parker, S. R., Cutler, H.G., Schreinner, P. R. 1995. Koninginin C: isolation of a biologically active natural product from *Trichoderma koningii*. Bioscience Biotechnology Biochemistry 59:1126-1127.
- Papavizas, G.C., Lumsden, R.D. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. Annual Review of Phytopathology 18:389-413.
- Reyes, R.T., Rodríguez, G.G., Pupo, Z.A.D., Alarcón, P.L., Limonta, C.Y. 2007. Efectividad *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai para el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Pyricularia grisea* Sacc. aislados en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Fitosanidad 11 (1):29-33.

- Robinson, P. M., Garret, M.K. 1969. Identification of volatile sporostatic factors from cultures of *Fusarium oxysporum*. Transactions of the British Mycological Society 52:293-299.
- Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turra, D., Woo, S.L., Lorito, M. 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant pathogenic fungi. Molecular Plant-Microbe Interactions 22:291.
- Sid Ahmed, A., Ezziyyani, M., Pérez, S., Candela, M. E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. European Journal of Plant Pathology 109:418-426
- Sivakumar, D., Wilson W., R. L. C. Wijesundera, F. M. T. Marikar y Abeyesekere, M. 2000. Antagonistic Effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica 28 (3):240-247.
- Taylor, A. 1986. Some aspects of the chemistry and biology of the genus *Hypocrea* and its anamorphs, *Trichoderma* and *Gliocladium*. Protection Nova Scotia Inst Science 36:27-58.
- Watanabe, S., K. Kumakura, H., Kato, H., Iyozumi, Togawa K., Nagayama K. 2005. Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum* SKT-1. Journal General Plant Pathology 71:351–356.
- Vera, R., Moreno, B., Acevedo, R., Trujillo, E. 2005. Caracterización de aislamientos de *Trichoderma* spp. por tipo de antagonismo y electroforesis de isoenzimas. Fitopatología Venezolana 18 (1):2-8.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I. 2000. Induction and accumulation of proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiology Biochemistry 38:863-873.

## CONCLUSIONES GENERALES

Los aislamientos nativos de *Trichoderma* spp., ratifican la capacidad cosmopolita de este organismo y su diversidad, debido a que las cinco cepas aisladas obtuvieron resultados altamente significativos.

Las cepas nativas de *Trichoderma* spp., mostraron un gran potencial antagónico y antibiótico; por lo que se les considera como una alternativa de biocontrol.

Las diferentes cepas nativas de *Trichoderma* spp., aisladas en suelos con alta incidencia de *P. parasitica* y *F. oxysporum* están adaptadas a las condiciones del agroecosistema de jamaica.

Se recomienda realizar pruebas en invernadero y campo para evaluar el verdadero potencial antagónico e inhibidor de las estas cepas, para constituir una alternativa viable y ecológica para los productores de jamaica del estado de Guerrero.