



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**EFFECTIVIDAD DE *Trichoderma* spp. SOBRE LA
ENFERMEDAD "PATA PRIETA" EN JAMAICA (*Hibiscus
sabdariffa*) *In vitro* E *In vivo* EN GUERRERO, MÉXICO**

Eduardo Osorio Hernández

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: **EFFECTIVIDAD DE *Trichoderma* spp. SOBRE LA ENFERMEDAD "PATA PRIETA" EN JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) *In vitro* E *In vivo* EN GUERRERO, MÉXICO** realizada por el alumno Eduardo Osorio Hernández bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

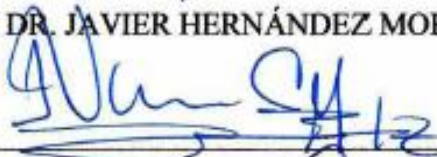
DOCTOR EN CIENCIAS

FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR



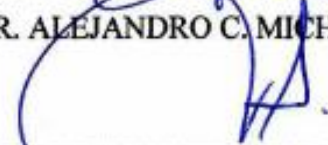
CONSEJERO: DR. JAVIER HERNÁNDEZ MORALES



ASESOR: DR. F. VÍCTOR CONDE MARTÍNEZ



ASESOR: DR. ALEJANDRO C. MICHEL ACEVES



ASESOR: DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR



ASESOR: DR. HUMBERTO VAQUERA HUERTA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre del 2014

EFFECTIVIDAD DE *Trichoderma* spp. SOBRE LA ENFERMEDAD “PATA PRIETA” EN JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) *In vitro* E *In vivo* EN GUERRERO, MÉXICO

Osorio-Hernández, Eduardo

Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

El cultivo de jamaica es uno de los más importantes en México por sus diversos usos, sin embargo, uno de los factores limitantes es la enfermedad conocida como “pata prieta”, causada por *P. parasítica* y *F. oxysporum*. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la efectividad de *Trichoderma* spp., en plantas de jamaica en campo e invernadero y a nivel *In Vitro* el efecto de glucanasas y quitinasas producidos por *Trichoderma* spp., en el crecimiento micelial de *P. parasitica* y *F. oxysporum*. Las especies evaluadas fueron *T. asperellum*, *T. virens*, *T. gamsii* y *T. longibrachiatum*. La evaluación de campo e invernadero se encontró que *Trichoderma* spp., tuvo efecto en la incidencia de la “pata prieta” y en la parte aérea de la planta de acuerdo a las variables que se evaluaron. Por otro lado, al evaluar las quitinasas y glucanasas producidas por las cuatro especies de *Trichoderma* se encontró que presentaron actividad enzimática y específica. Por lo anterior, las enzimas mostraron cierto efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *P. parasitica* y *F. oxysporum*. *Trichoderma* spp., es una alternativa para el manejo de la pata prieta en el cultivo de la jamaica en el Estado de Guerrero.

Palabras clave: Antibiótico, control biológico, enzimas, fitopatógenos

EFFECTIVENESS OF *Trichoderma* spp. ON DISEASE "BLACK SHANK" IN ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa*) *In vitro* and *In vivo* GUERRERO, MEXICO

Osorio-Hernández, Eduardo

Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

Roselle crop is one of the most important in Mexico, for its various uses, however, one of the limiting factors is the disease known as "black shank" caused by *P. parasitica* and *F. oxysporum*. The objective of this research was to evaluate the effectiveness of *Trichoderma* spp., in field and greenhouse roselle plants and *In Vitro* effect of glucanase and chitinase produced by *Trichoderma* spp., about the mycelial growth of *P. parasitica* and *F. oxysporum*. *In Vitro*, field and greenhouse were evaluated *T asperellum*, *T. virens*, *T. gamsii* and *T. longibrachiatum*. The greenhouse and field evaluation showed that *Trichoderma* spp., had an effect on the incidence of "black shank" in addition to the aerial part of the plant. The evaluation of chitinases and glucanases by four species of *Trichoderma* showed that they have enzymatic specific activity. Therefore enzymes revealed inhibitory effect on the mycelial growth of *P. parasitica* and *F. oxysporum*. *Trichoderma* spp., is an alternative for the management of "black shank" in Roselle cultivation in the state of Guerrero.

Keywords: Antibiotic, biological control, enzymes, plant pathogens

DEDICATORIAS

A **Dios**, por ser el guía de mi vida, porque siempre me ha acompañado en los momentos de triunfos y fracasos, gracias a Él, he podido ser lo que siempre anhelé, gracias Dios por concederme este sueño.

Con todo mi amor y respeto a mis padres.

Sra. Guadalupe Hernández Hernández

Sr. Agustín Osorio Martínez

A quienes dedico este humilde trabajo con profundo amor; a quienes me dieron lo máspreciado en este mundo, “**LA VIDA**” pero en especial a mi madre quién siempre ha estado conmigo en los buenos y en los malos momentos.....

A mis Hermanos (as)

German, Claudina, Rosaura, Isabel, Victorino, Patricia, Eulogia y Beatriz

A mis Tíos (as) Marcos, Mario y Estela que siempre me brindaron su confianza y por sus consejos tan acertadas para poder alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico para la realización del programa doctoral.

Al **Colegio de Postgraduados** por las facilidades otorgadas en el Programa de Fitosanidad-Fitopatología, Campus Montecillo.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por apoyar mi programa doctoral, por medio del Programa de Formación de Profesores.

Al **Dr. Javier Hernández Morales** por todo el apoyo, dirección y revisión para este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

Al **Dr. F. Víctor Conde Martínez** por la confianza depositada en mí para este trabajo, por permitir hacerme parte de su equipo de investigación, por todo el apoyo, revisión y sugerencias y por la amistad.

Al **Dr. A. Casimiro Michel Aceves** por las aportaciones y sugerencias a esta tesis y por la confianza y amistad que siempre me ha brindado.

Al **Dr. Juan Cibrián Tovar** por su paciencia y disposición en la participación de mi comité, así como por sus aportaciones.

Al **Dr. Humberto Vaquera Huerta** por todas sus sugerencias y disposición para este trabajo y por su amistad.

A los doctores **Francisco Daniel Hernández Castillo y Raúl Rodríguez Herrera**, por su amistad y por sus múltiples consejos y motivación en mis estudios.

A mis amigos **Sarah, Nuvia, Edgar, Linda, Graciela**... pocos pero muy valiosos.

A las secretarías de la coordinación de Fitopatología **Verónica, Hilda, Michelle**, además de **Martha y Aurora** que siempre se portaron serviciales en cualquier solicitud.

A todos los integrantes de la comunidad de fitopatología profesores, trabajadores y compañeros, que han contribuido a mi desarrollo y crecimiento profesional.

CONTENIDO	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVOS.....	2
CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1.1. Origen y descripción botánica de la jamaica.....	3
1.2. Problemas fitosanitarios de jamaica.....	4
1. 3. Control Biológico.....	5
1. 4. Género <i>Trichoderma</i>	6
1.5. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i>	7
1.6. LITERATURA CITADA.....	11
CAPÍTULO II.....	17
BIOCONTROL DE <i>Phytophthora parasitica</i> Y <i>Fusarium oxysporum</i> POR <i>Trichoderma</i> spp. EN PLANTAS DE <i>Hibiscus sabdariffa</i> EN CAMPO E INVERNADERO.....	17
2.1. RESUMEN.....	17
2.2 ABSTRACT.....	18
2.4. INTRODUCCIÓN.....	19
2.5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
2.7. CONCLUSIONES.....	34
2.8. LITERATURA CITADA.....	34
CAPÍTULO III.....	38
Antagonismo <i>In Vitro</i> de quitinasas y glucanasas producidas por <i>Trichoderma</i> spp., sobre <i>Phytophthora parasitica</i> y <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	38

3.1. RESUMEN.....	38
3.2. ABSTRACT.....	39
3.3. INTRODUCCIÓN.....	40
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
3.6. CONCLUSIONES.....	55
3.7. LITERATURA CITADA.....	55
CAPÍTULO IV.....	59
4.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	59
4.2. LITERATURA CITADA.....	61
5.1 CONCLUSIONES GENERALES.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Valores de análisis de suelos de los lotes 1 y 2.....	26
2. Comparación de medias de las variables incidencia, altura de la planta, diámetro del tallo, fresco y seco del cáliz de plantas de jamaica, inoculadas con <i>Trichoderma</i> spp. en el lote 1.....	27
3. Comparación de medias de las variables incidencia, altura de la planta, diámetro del tallo, fresco y seco del cáliz de las plantas de jamaica, inoculadas con <i>Trichoderma</i> spp. en el lote 2.....	28
4. Influencia de <i>Trichoderma</i> spp. en la incidencia, crecimiento y biomasa de plantas de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) inoculadas con <i>P. parasitica</i> de 60 días de edad en invernadero.....	31
5. Medias obtenidas de influencia de la aplicación de <i>Trichoderma</i> spp. en el crecimiento, biomasa e incidencia de <i>F. oxysporum</i> en plantas de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) de 60 días de edad en invernadero.....	33
6. Producción de glucanasas por cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	49
7. Producción de quitinasas por cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	50
8. Efecto antagónico de las glucanasas de <i>Trichoderma</i> spp., sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de <i>P. parasitica</i> (<i>Pp</i>) y <i>F. oxysporum</i> (<i>Fo</i>).....	53
9. Efecto antagónico de las quitinasas de <i>Trichoderma</i> spp., sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de <i>P. parasitica</i> (<i>Pp</i>) y <i>F. oxysporum</i> (<i>Fo</i>).....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pag.
1.-Datos promedios de temperatura máximos, mínimos, promedio y humedad relativa, de cada mes (2012). T. Max=Temperatura máxima, T. Min= Temperatura mínima, T. promedio= temperatura promedio, H. R.=Humedad relativa.....	24
2.-Porcentaje de la incidencia de la “pata prieta” en la jamaica en condiciones de campo, en dos lotes (1 y 2). T9 (<i>T. asperellum</i>), T6 (<i>T. virens</i>), T13 (<i>T. gamsii</i>), T19 (<i>T. longibrachiatum</i>), TQ (Tratamiento químico) y TES (Testigo-sin aplicar).....	25
3.-Curva de calibración de N-acetilglucosamina para determinación de quitinasas...	44
4.-Curva de calibración de Albumina Sérica Bovina (BSA) para cuantificación de proteínas.....	44
5. -Curva de calibración de glucosa, para cuantificación de actividad por glucanasas..	46
6.-Efectividad de quitinasas (A) y glucanasas (B) de <i>T. asperellum</i> (T9), <i>T. virens</i> (T6), <i>T. gamsii</i> (T13), <i>T. longibrachiatum</i> (T19) y Testigo (sin aplicar) sobre <i>P. parasitica</i>	52
7.- Efectividad de quitinasas (A) y glucanasas (B) de <i>T. asperellum</i> (T9), <i>T. virens</i> (T6), <i>T. gamsii</i> (T13), <i>T. longibrachiatum</i> (T19) y Testigo (sin aplicar) sobre <i>F.oxysporum</i>	55

INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de la jamaica es de importancia por los diversos usos potenciales que tiene. En la actualidad se cultiva en los estados de Guerrero, Oaxaca, Michoacán (SIAP, 2012). En el Estado de Guerrero se siembra bajo condiciones de temporal, asociadas con maíz, por su volumen de producción constituyen la zona “jamaiguera” de mayor importancia de ahí que se le conozca en esta zona como “Oro rojo” (Rojas, 1999). Su importancia radica en la fibra de buena calidad y los cálices que se aprovechan para la elaboración de bebidas no alcohólicas, jaleas, mermeladas y cosméticos. Sin embargo, este cultivo es afectado por diversos problemas fitosanitarios, entre los que destaca la pata prieta de la jamaica causado por *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, estos normalmente se manifiestan por la pudrición del cuello, enseguida ataca a las raíces y parte superior del cuello, como consecuencia de esta pudrición, en el follaje se produce una clorosis y caída prematura de hojas y frutos (Hernández y Romero, 1990). La incidencia de la pata prieta puede llegar hasta el 40% en parcelas cultivadas de jamaica (González, 2008). El principal control de estos fitopatógenos se realiza con la aplicación de agroquímicos, entre ellos, etridiazol, fosetil-aluminio, metalaxyl, azoxystrobin y propamocarb clorhidrato (Pérez *et al.*, 2004); sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ocasiona un impacto ambiental, toxicidad al hombre y resistencia de patógenos; además de un incremento en los costos de producción, por lo que diversos trabajos de investigación sugieren un manejo integrado de la enfermedad que debe ser eficiente y de bajo costo. La necesidad de encontrar mecanismos que eleven la productividad del campo, ha impulsado la búsqueda de estrategias de manejo de enfermedades agrícolas que sean alternativas eficientes al control químico y que además implique bajar el riesgo ambiental y sanitario

(Zavaleta, 1999; Gallegos *et al.*, 2004). *Trichoderma* se presenta como una alternativa para el manejo de enfermedades; hay reportes que indican que confieren protección a semillas, plántulas hortalizas, en contra del ataque de hongos, esto debido a que *Trichoderma* spp. presenta diferentes mecanismos de acción: micoparasitismo, competencia y por la producción de metabolitos secundarios o enzimas (Fernández, 2001; Michel-Aceves *et al.*, 2005; Corrêa *et al.*, 2007). Se ha reportado que tiene efecto antagonista sobre algas del suelo como *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum* y hongos como *Fusarium oxysporum* entre otros (Ezziyyani *et al.*, 2004, Djonović *et al.*, 2006, Sempere *et al.*, 2007). De acuerdo con ezziyyani *et al.* (2005) el género *Trichoderma* induce resistencia a la planta, incrementando la respuesta de crecimiento y tolerancia a estrés, ocasionado por factores adversos como la presencia de fitopatógenos (Vinale *et al.*, 2008). 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 nativos que sean capaces de competir con los patógenos dentro de un mismo nicho ecológico (Andrews, 1992). Para esto es conveniente distinguir capacidades potenciales de dichos agentes y la medida en que las mismas se expresan dentro de cada agroecosistema.

OBJETIVOS

Evaluar la eficiencia biológica de *Trichoderma* spp. sobre la incidencia de la “pata prieta” en plantas de jamaica causado por *P. parasitica* y *F. oxysporum* en condiciones de campo e invernadero.

Evaluación de enzimas producidas por *Trichoderma* spp. en la inhibición micelial de *P. parasitica* y *F. oxysporum*.

CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Origen y descripción botánica de la jamaica

Hibiscus sabdariffa también conocida como *rosa de jamaica*, *rosa de Abisinia* o *flor de jamaica*, pertenece a la familia de las Malváceas y es originaria de África tropical, aunque su cultivo se extiende por México, América Central y del Sur y Sudeste Asiático (Sáyago-Ayerdi y Goñi, 2010). Es una planta herbácea anual propia de climas secos subtropicales, montañosos, de matorral espinoso. La planta puede crecer de 0.5 a 3 metros con hojas simples, lobulada, con margen aserrado y pedúnculo solitario; flores solitarios y axilares; cálices de color rojo los cuales son comestibles, el fruto una capsula, con semillas en forma de riñon (Morton, 1987).

1.1.1. Usos y propiedades de la jamaica

Se utiliza en mermeladas, jaleas, salsas, caldos, gelatina, bebidas refrescantes y pasteles. Además utiliza para el té, helados, sorbetes, mantequilla, pasteles, salsas y otros postres. Hojas tiernas y los tallos se comen como ensalada (Duke, 1983). Las semillas se han utilizado como un sustituto del café afrodisíaco. En la planta de la jamaica se acumula una gran cantidad de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, proantocianidinas, flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavononas y antocianinas (Galicia-Flores *et al.*, 2008). Las antocianinas son altamente reductoras, por lo que exhiben fuerte actividad antioxidante, su consumo puede proteger al organismo contra daños provocados por los radicales libres y la peroxidación de los lípidos (Tsai *et al.*, 2002).

Además, presentan alcaloides, ácido ascórbico, riboflavina, niacina, ácido ascórbico, tiamina, anisaldehído, b-caroteno, b-sitosterol, ácido cítrico, ácido málico, galactosa,

mucopolisacáridos, pectina, ácido protocatecuico, polisacáridos, quercetina, ácido esteárico y cera (Hirunpanich *et al.*, 2005). El consumo de los extractos que se obtienen a partir de los cálices, se les han atribuido diversas propiedades medicinales como efectos diuréticos, coleréticos, reducción de la presión arterial, estimulación de la peristalsis intestinal, reducción de los niveles de colesterol; acción astringente, digestiva, emoliente y sedativa, además en fiebre y daños en el hígado (Tsai *et al.*, 2002; Odigie, *et al.*, 2003). Por la actividad antioxidante de sus antocianinas, también pueden ayudar en la prevención y tratamiento de algunos tipos de cáncer (Chen *et al.*, 2003).

1.1.2. Producción mundial y nacional

A nivel mundial la flor de jamaica es poco conocida, siendo los países con mayor capacidad productiva y comercial (exportación) Taiwan, China, Corea de Sur, India y Sudán (Galicia-Flores *et al.*, 2008). A nivel nacional Guerrero ocupa el primer lugar en extensión sembrada con 13,679.00 ha, seguido por Michoacán y Oaxaca. Entre los tres Estados se siembra el 94 % de la superficie en México (SIAP, 2012).

1.2. Problemas fitosanitarios de jamaica

Una de las principales factores que impactan en la producción de jamaica son la plagas y enfermedades, la planta es susceptible al ataque de varios patógenos. Los insectos plaga que se han encontrado ocasionando daños en el cultivo de jamaica son *Atta mexicana*, *Sphenarium purpurascens*, *Melanoplus* spp. y *Aphis gossypii* (Pérez-Torres *et al.*, 2009).

Las enfermedades han sido reportadas como un factor limitante en la producción de jamaica en todo el mundo (Nwaukwu and Ataga, 2012). Las principales enfermedades en el cultivo de jamaica son: *Phytophthora parasitica*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Botrytis*

cinerea, *Sclerotium rolfsii*, *Phymatotrichopsis omnivora* (Swart y Langenhoven, 2000; Augstburger, 2000; Horst, 2008), *Fusarium nygamai* y *Rhizoctonia solani*, además de *Fusarium oxysporum* (Amusa *et al.*, 2005).

1.2.1 La pata prieta

La “pata prieta” fue reportado primera vez en México por Hernández y Romero (1990), quienes describieron a *Phytophthora parasitica* como el causante de dicha enfermedad en plantas de jamaica colectadas en el estado de Guerrero los síntomas se caracterizan por una pudrición del tallo a la altura del cuello de la planta, seguida de una clorosis, marchitez y caída prematura de hojas, lo que ocasiona la muerte de la planta (Escalante-Estrada *et al.*, 2001). En los últimos años la pata prieta ha tomado importancia ya que se reporta una incidencia del 40% (Gonzalez-Santin, 2008). Sin embargo, en países como Malasia, Nigeria y Estados Unidos reportan que *F. oxysporum* es el causante de la pata prieta (Ooi y Salleh, 1999; Amusa *et al.*, 2005; Ploetz y Palmateer, 2007). Estudios realizados en México han comprobado que la “pata prieta” es causada por *P. parasitica* (Osorio-Hernández *et al.*, 2014).

1.3. Control Biológico

El control biológico utiliza microorganismos de la microflora del suelo nativa o introducida antagonista, competidores y/o sus metabolitos secundarios; con la finalidad de disminuir la capacidad del agente patógeno para causar una enfermedad (Pal y McSpadden 2006. Dicklow (2014) mencionan que el biocontrol es el abatimiento o eliminación del organismo considerado como nocivo y se basa en interacciones negativas entre el agente de biocontrol y el patógeno. La necesidad de reducir el uso de fungicidas químicos y productos fitosanitarios de síntesis ha dado paso al uso de microorganismos benéficos. Los microorganismos más usados pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, etc. (Sid *et al.*, 2000).

1.4. Género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios (Harman, 2004). *Trichoderma* spp., es un hongo que pertenece a la Clase Deuteromycetes y al Orden Moniliales (clasificación asexual), entre las especies más destacados de este género son *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum*. De este microorganismo existen más de 50 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas (Pérez, 2006).

El género *Trichoderma* se encuentra en suelos abundantes en materia orgánica y pueden estar en los suelos con pH neutro hasta ácido. La versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación de este hongo ha permitido su uso en el control biológico (Papavizas, 1985). *Trichoderma* spp. produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, estas son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación (Trabanino *et al.*, 2003). El parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular. La competencia por el espacio y los nutrimentos es más favorable, principalmente para los hongos que se desarrollan en la superficie de las hojas antes de efectuar la penetración, no actuando sobre aquellos que penetran rápidamente (Orietta y Larrea, 2001; Kubicek y Harman, 2002).

1.4.1. Características morfológicas de *Trichoderma* spp.

Los conidióforos hialinos no verticiladas, las fialides pequeñas e intercalados, hifas pueden oscilar entre 3 a 12 μm de diámetro (Chaverri y Samuels, 2003). Los conidios tienen de 2 a 3 μm de diámetro en promedio son redondos o de forma ovoide, lisos y se observan hialinos o de color verde brillante al microscopio (Samuels, 1996). Las clamidosporas tienden a ser globosas a

subglobosas, terminales a intercalares de tono verde y menores a 15 μm de diámetro (Trabanino *et al.*, 2003).

1.4.2. Importancia de *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp., es uno de los antagonistas más usados debido a sus diferentes mecanismos de acción, tales como micoparasitismo, antibiosis y competencia por el espacio y nutrientes (Howell, 2006). Recientes avances han demostrado que los efectos de *Trichoderma* sobre las plantas, incluyendo la inducción de resistencia sistémica o localizada (Ha, 2010). Estos hongos colonizan la epidermis de la raíz y capas externas corticales, liberando moléculas bioactivas (Papavizas, 1985). Al mismo tiempo, el transcriptoma y el proteoma de plantas son sustancialmente alterados, además de la inducción a la resistencia, aumento del crecimiento y la absorción de nutrientes de las plantas (Harman, 2006). Los estudios de micoparasitismo han demostrado que estos hongos producen una rica mezcla de enzimas antifúngicas como quitinasas y β -1, 3 glucanasas. Estas enzimas son sinérgicas, e incluso con otras enzimas antifúngicas (Infante *et al.*, 2009). Los genes que codifican las enzimas parecen útiles para producir plantas transgénicas resistentes a las enfermedades. Debido a lo anterior, su espectro antagónico es amplio y puede influir sobre hongos del suelo tales como *P. capsici*, *P. ultimum*, *F. oxysporum*, *Sclerotium*, *Mycosphaerella fijiensis*, así como también contra el nematodo *Meloidogyne javanica* (Orietta, 2001; Mohammed, 2004; Ranasingh *et al.*, 2006).

1.5. Mecanismos de acción de *Trichoderma*

Los principales mecanismos son la competencia por espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, estos tienen una acción directa frente al hongo fitopatógeno (Pal y McSpadden, 2006). Otros autores han sugerido, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Harman, 2006). *Trichoderma* induce mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos como

es la activación en la planta de compuestos relacionados con la resistencia (inducción de resistencia), con la detoxificación de toxinas excretadas por patógenos y la desactivación de enzimas de estos durante el proceso de infección y la solubilización de elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas (Vera *et al.*, 2002). Así mismo, tienen la capacidad de crear un ambiente favorable para el desarrollo del sistema radical lo que aumenta la tolerancia de la planta al estrés (Mukherjee *et al.*, 2013).

1.5.1. Antagonismo de *Trichoderma*

Todo organismo que se opone de alguna manera a la acción, presencia o supervivencia de otro, se considera que es un organismo antagonista (Infante *et al.*, 2009). Esta relación antagónica puede manifestarse por antibiosis, lisis, reacciones inmunológicas, competencia, parasitismo y predación; siendo los más importantes en el control biológico de fitopatógenos el hiperparasitismo, la antibiosis y la competencia (Pal y McSpadden, 2006). El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos de suelo y en la rizósfera, los antagonistas producen antibióticos, actúan en competencia por nutrientes y/o inducen resistencia en el hospedero (Infante *et al.*, 2009). *Trichoderma* spp., tiene efecto antagonico diversos patógenos como *P. capsici*, *P. aphanidermatum*, *R. solani* y *A. niger* (Osorio *et al.*, 2009; Kumar, 2010; Bhale *et al.*, 2013).

1.5.2. Antibiosis de *Trichoderma*

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos (Mohd *et al.*, 2013). Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el

desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico (Mukherjee *et al.*, 2013). Tales sustancias inhibidoras son consideradas "antibióticos" (Infante *et al.*, 2009).

Dennis and Webster (1971) fueron los pioneros en esta temática, con la realización de los trabajos más completos acerca de la función de los antibióticos producidos por hongos del género *Trichoderma* sobre patógenos de las plantas. Ellos relacionaron la actividad antibiótica de *Trichoderma* spp. con compuestos no volátiles, entre los que se encontraban uno identificado como trichodermina y otros metabolitos peptídicos. Además, determinaron que *Trichoderma* produce compuestos como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina.

Estudios realizados por Osorio-Hernandez *et al.* (2011), encontraron que los metabolitos no volátiles de *Trichoderma* spp. inhiben el crecimiento de *Phytophthora capsici*. Infante *et al.* (2009) informaron la presencia de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica en cuatro aislamientos de *Trichoderma* y concluyeron que los mismos reducen el crecimiento micelial de *P. nicotianae* y *R. solani* en medios de cultivo envenenado con filtrados líquidos donde se habían cultivado las cepas antagónicas. Otros metabolitos que produce *Trichoderma* son: 6-pentil- α -pirona, harzianolide y harzianopyridone estos activaban los mecanismos de defensa de las plantas y regulan crecimiento en tomate y canola (Vinale *et al.*, 2008). Dal Bello *et al.* (1997) mencionan que *Trichoderma* posee mecanismos fungistáticos que impiden el desarrollo de los hongos fitopatógenos, así como la capacidad de especies de *Trichoderma* para sintetizar sustancias volátiles involucradas en el complejo responsable de ese fenómeno. Dichos componentes son; dióxido de carbono, etanol, acetaldehído, acetona, propanol, isobutanol e isopentanol, los cuales en diferentes concentraciones intervienen en la regulación del mecanismo fungistático.

1.5.3. Competencia de *Trichoderma*

Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás (infante *et al.*, 2009). Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Fravel, 2005).

Trichoderma spp., está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir (Reza y Samimi, 2013). La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, y a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control (Harman *et al.*, 2004). La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina y pectinas, entre otros) y microelementos (Infante *et al.*, 2009).

1.5.4 Micoparasitismo de *Trichoderma*

El micoparasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista (Ranasingh *et al.*, 2006). El parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular (Vinale *et al.*, 2008). Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, Beta-1-3-glucanasa y proteasa, que lisan (rompen) las paredes de las hifas, o esclerocios de hongos parasitados (Orietta *et al.*, 2001). *Trichoderma* se ha reportado como hiperparásito de un gran número de hongos fitopatógenos al atacar

directamente y producir la lisis de micelio y también de esclerocios de hongos (Correa *et al.*, 2007). Los hongos micoparasíticos fueron clasificados en dos grandes grupos: biotróficos (aquellos que mantienen una relación de equilibrio con el hospedero) y necrotrofos (llamados también destructivos) (Infante *et al.*, 2009). Las enzimas son un componente de gran importancia en el micoparasitismo; estas degradan la pared celular del hospedero (Howell, 2006).

1.5.5. Inducción de resistencia en plantas por *Trichoderma*

La inducción de resistencia sistémica por *Trichoderma* en el hospedero es uno de los mecanismos indirectos de mayor interés en la actualidad (Mukherjee *et al.*, 2013). La inducción de resistencia sistémica por *Trichoderma* sp., involucra cambios celulares en el hospedero, tales como un aumento de depósitos de calosa en el interior de la pared celular y aumento en la actividad de peroxidasa y quitinasa (Harman, 2006). Otros procesos relacionados con la inducción sistémica contra patógenos del suelo, tal como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* son el confinamiento, la inhibición del patógeno y los cambios histológicos en el hospedero. Estos últimos relacionados con la producción de reguladores de crecimiento y estimulación de la división, diferenciación y crecimiento celular en la planta por el agente elicitor (Hermosa *et al.*, 2013).

1.6. LITERATURA CITADA

- Amusa, N. A., A. A. Adegbite, M. O. Oladapo. 2005. Vascular wilt of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest region of South-western Nigeria. *Plant Pathology Journal* 4: 122-125.
- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30:603-635.
- Augstburger, F., J. Berger, U. Censkowsky, P. Heid, J. Milz, and C. Streit. 2000. Organic farming in the tropics and subtropics. Roselle. Exemplary description of 20 crops. Editorial Naturland e. V., Bavaria, Germany, 14 p.

- Bhale, U. N., P. M. Wagh and J. N. Rajkonda. 2013. Antagonistic confrontation of *Trichoderma* spp against fruit rot pathogens on Sapodilla (*Manilkara zapota* L.). *Journal of Yeast and Fungal Research*, 4: 5-1.
- Chaverri, P. G. J., D.F. Farr, E. B. McCray. Retrieved February 18, 2014. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. from/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.
- Chen, C. C., J. D. Hsu, S. F. Wang, H. C. Chiang, M. Y. Yang, E.S. Kao, Y. C. Ho, C. J. Wang, 2003. *Hibiscus sabdariffa* Extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51:5472-5477.
- Correa, S. M. Mello, R. Z. Ávila, B. L. Minare, R. R. Padua, y D. Gomes. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 11: 3-9.
- Dal bello, G. M., C. Monaco and A. R. Chaves. 1997. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. *Rev. Iberoam. Micol.* 14:131-134.
- Dennis, C. and J. Webster. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* 2. production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57- 41.
- Dicklow, M. B. 2014. Biological control of plant diseases. *UMass Extension*. Pagina visitada 08/07/2014. <https://extension.umass.edu/vegetable/articles/biological-control-plant-diseases>.
- Djonovié, S., M. M. Pozo and C. M. Kenerley. 2006. Tvbg3, a beta- 1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol* 72:7661-70.
- Duke, J. A. 1983. Handbook of energy crops. Unpublished. Purdue University, West Lafayette.Center for New Crops & Plant Products. Disponible en: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hibiscus_sabdariffa.html. Consultado el 10 de julio de 2012.
- Escalante-Estrada, Y. I., Osada-Kawasoe, S. y J. A. Escalante-Estrada. 2001. Variabilidad patogénica de *Phytophthora parasitica* D., en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:84-89.
- Eslaminejad, T. and M. Zakaria. 2011. Morphological characteristics and pathogenicity of fungi associated with Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) diseases in Penang, Malaysia. *Microbial Pathogenesis* 51:325-337.
- Ezziyyani, M., M. E. Requena y M. E. Candela. 2005. Producción de proteínas-Pr en la inducción de resistencia de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum anuum* L) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología*. 27:143-153.
- Ezziyyani, M., S. C. Perez, M. E. Requena, A. A. Sid y M. E. Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum anuum* L). *Anales de Biología* 26:35-45.

- Fernández, L. V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 62: 96-100.
- Fravel, D. R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology 43: 337-359.
- Galicia-Flores, L. A., Y. Salina-Moreno, B. M. Espinosa-Garcia, C. Sanchez-Feria,. 2008. Caracterización físico-química y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. Rev. Chapingo Serie Horticultura 12:121-129.
- Gallegos, M. G., Cepeda, S. M. y Olayo, P. R. P. 2003. Entomopatógenos, Editorial, trillas, México, pp 9-10.
- González-Santin, S. L. L. 2008. Etiología de la enfermedad de la ‘pata prieta’ de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de Licenciatura, Ingeniero Agrónomo en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo, México, pp 49-51.
- Ha, T. N. 2010. Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in Vietnam. J. Issaas, 17-21.
- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito . 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. 2:43-56.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96: 190-194.
- Hermosa, R., B. Rubio, M., R. E. Cardoza, C. Nicolas, E. Monte, S. Gutierrez. 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. International Microbiology 16: 69-80.
- Hernández, M. J. y C. S. Romero. 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 67: 50-54.
- Hernandez-Onate, M.A., E.U. Esquivel-Naranjo, A. Mendoza-Mendoza, A. Stewart, A. H. Herrera-Estrella. 2012. An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109:14918-14923.
- Hirunpanich, V., A. Utaipat, N. P. Morales, N. Bunyaphatsaea, H. Sato, A. Herunsalee, C. Suthinsisang. 2005. Antioxidant effect of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) in vitro using rat lowdensity lipoprotein (LDL). Biological and Pharmaceutical Bulletin 28:481-484.
- Horst, R. K. 2008. Westcott’s Plant Disease Handbook. 7th edition. Springer Verlag Berlin Heidelberg. NewYork. 1317 p.
- Howell, C. R. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. Phytopathology, pp. 178-180.

- Infante, D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 24: 14-21.
- Kubicek, C. P. and G E, Harman. 2002. *Trichoderma* and *Gliocladium* (vol. I). Basic biology, taxonomy and genetics. 14-24 pp.
- Kumar, M. V. 2010. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Phytology* 2: 28-35.
- Michel-Aceves. A. C., De la C. Reyes, A., S. M. A Otero, D. O. Rebolledo y G. R. Lezama. 2005. Potencial antagonístico *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Zinder y Hansen y *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) *in vitro* en invernadero. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23:286-293.
- Mohammed, E., P. C. Sánchez, S. A. Ahmed, M. E. Requena, L. Rubio y M. E. Candela, 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en planta de pimiento (*Capsicum annuum*). *Anales de Biología* 26:35-45.
- Mohd, J. J., N. Ahmad, D., T. Ahmad B., A. Hussain B. and M. Ahmad B. 2013. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plantpathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences* 1: 39-57.
- Morton, J. F. 1987. Roselle, *Hibiscus sabdariffa* L. En: Morton, J.F. (Ed.). *Fruits of Warm Climates*. Miami, Fl. USA. 281-286.
- Mukherjee, P. K., B. A. Horwitz, A. Herrera-Estrella, M. Schmoll y C. M. Kenerley. 2013. *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:105–29.
- Nwaukwu, I. A. and A. E. Ataga, 2012. Fungi associated with *Hibiscus sabdariffa* linn (yakwa) seed from plateau state. *Scientia Africana* 11:125-129.
- Odigie, I. P., Ettarh, R. R. and Adigun, S. 2003. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology* 86:181-185.
- Ooi, K. H. and B. Salleh. 1999. Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum*, the causal organism of vascular wilt on roselle in Malaysia. *Biotropia* 12: 31-41.
- Orietta F. y V. Larrea. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Costa Rica. Consultado 26 Marzo. 2008. Disponible en: <http://web.catie.ac.cr/informacion/rmip/rev62/96-100>.
- Osorio-Hernandez, E., F. D. Hernandez-Castillo, G. Gallegos-Morales, R. Rodriguez-Herrera, F. Castillo-Reyes. 2011. *In-vitro* behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian. *African Journal of Agricultural Research* 6:4594-4600.
- Osorio-Hernández, E., J. Hernández-Morales, V. Conde-Martínez, A. C. Michel-Aceves, J. Cibrián-Tovar and H. Vaquera-Huerta. 2014. Biocontrol of *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma* spp. in *Hibiscus sabdariffa* plants under field and greenhouse conditions. *African Journal of Agricultural Research*, 9:1398-1345.

- Pal, K. K. and B. McSpadden G. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor, APSnet 1-25.
- Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Biology, ecology and potential for biological control. Annual Review Phytopathology 23:23-54.
- Pérez, M. L., L. J. Durán-Ortiz, R. Ramírez-Malagon, J. R. Sánchez-Pale y V. Olalde-Portugal. 2004. Sensibilidad *in vitro* de aislados del hongo *Phytophthora capsici* a funguicidas. Memorias Primera Convención Mundial del Chile. León, Guanajuato, México. Resumen, pp. 144-150.
- Pérez-Torres, B. C., A. Aragón García, N. Bautista Martínez, A. M. Tapia Rojas y J. F. López-Olguín. 2009. Entomofauna asociada al cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en el municipio de Chiautla de Tapia, Puebla. Acta Zoológica Mexicana 25: 239-247
- Ploetz, R. C., and Palmateer, A. J. 2007. First report of Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* on Roselle in the United States. Plant Disease 91: 639.
- Ranasingh, N., A. SaurabhA and M, Nedunchezhiyan. 2006. Use of *Trichoderma* in Disease Management. Orissa Review 68-70.
- Reza, S, M, M. and Z. Samimi. 2013. Evaluation of *Trichoderma* spp., as biological agents in some of plant pathogens. Annals of Biological Research 4:173-179.
- Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. Mycological Research 100:923-935.
- Sáyago-Ayerdi, S. G. y I. Goñi. 2010. *Hibiscus sabdariffa* L: Fuente de fibra antioxidante. Archivos latinoamericanos de nutrición 60:79-84.
- Sempere, F. and M. P. Santamarina. 2007. *In vitro* biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler Ander different environmental conditions. Mycopathologia. 163:183-90.
- SIAP. 2010. Anuario estadístico de la producción agrícola. Dirección electrónica: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>. Consultado el 04 de junio de 2014.
- Sid Ahmed A. C., S. Pérez y M. E. Candela. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. European Journal of Plant Pathology 106: 817-824.
- Swart, L. and P. Langenhoven. 2000. First report of Botrytis blight, caused by *Botrytis cinerea*, on *Hibiscus* in South Africa Plant Disease 84: 487-48.
- Trabanino R, C. Kuniyoshi y M. Michel. 2003. Manual de agentes de control biológico. [Internet]. Tegucigalpa (Honduras): Centro de control biológico para Centroamérica, Biblioteca Wilson Popenoe- Zamorano. Disponible en: <<http://www.zamorano.edu/biblioteca>>.

- Tsai, P. J., J. McIntosh, P. Pearce, B. Camden and B. R. Jordan. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. Food Research International 35:351-356.
- Vera, D., H. Pérez y H. Valencia. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfatos de la rizosfera del arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). Acta Biológica Colombiana 7: 33-40.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalberti, R. Marra, M. J. Barbetti, H. Li, S. L. Woo and M. Lorito. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. Physiological and Molecular Plant Pathology 72:80–86.
- Zavaleta, M. E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Terra 17: 201-207.

CAPÍTULO II

BIOCONTROL DE *Phytophthora parasitica* Y *Fusarium oxysporum* POR *Trichoderma* spp. EN PLANTAS DE *Hibiscus sabdariffa* EN CAMPO E INVERNADERO

Eduardo Osorio-Hernández¹, Javier Hernández-Morales¹, Víctor Conde-Martínez¹, Alejandro Casimiro

Michel-Aceves², Juan Cibrián-Tovar¹, Humberto Vaquera-Huerta¹.

¹ Colegio de Postgraduados. 56230, Montecillo, Estado de México.

² Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero,

Av. Vicente Guerrero No. 81, C. P. 40000. Colonia Centro. Iguala, Guerrero, México.

2.1. RESUMEN

El cultivo de jamaica es uno de los más importantes en México, por sus diversos usos, sin embargo, algunos de los limitantes son *P. parasitica* y *F. oxysporum*. Se evaluaron *T. asperellum*, *T. virens*, *T. gamsii* y *T. longibrachiatum* incluido el tratamiento químico (azoxystrobin y Benomilo) contra *P. parasitica* y *F. oxysporum* en las plantas de jamaica, mantenidas en condiciones de invernadero y campo (2012). En invernadero se utilizaron plantas de 30 días de edad, las cuales fueron inoculadas con 7 g de olote/*Trichoderma*, posteriormente a los cuatro y tres días, se inocularon con *P. parasitica* y *F. oxysporum*, respectivamente. En campo se realizaron tres aplicaciones de *Trichoderma*, en la base de la planta, así como la aplicación de azoxystrobin a los 30 días y benomilo a los 60 días. En campo *T. longibrachiatum* mostró menor incidencia de la “pata prieta” en 15 % respectivamente y en uno de los lotes el rendimiento en peso seco de cáliz fue mayor. En invernadero, las plantas inoculadas *T. gamsii* y *T. longibrachiatum* disminuyeron en 20 y 30% de incidencia de *P. parasitica*, respectivamente. *Trichoderma* aumento el peso fresco y seco, además se obtuvo mayor altura en plantas. *T. gamsii*

y *T. virens* aumentaron la altura, peso fresco y seco en plantas de jamaica en combinación de *F. oxysporum*.

Palabras clave: *Trichoderma virens*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma gamsii*, jamaica.

2.2. ABSTRACT

In Mexico, the Roselle crop is one of the most important because it's different uses as food. However, production is affected by *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. Under greenhouse conditions, 30 days-old plants were used and inoculated with 7 g of corncob/*Trichoderma*, subsequently four or three days later were inoculated with *P. parasitica* and *F. oxysporum*. Under field conditions, three *Trichoderma* applications on base of the plant were utilized, and azoxystrobin and Benomyl were applied at 30 and 60 days after planting. Field results showed that *T. longibrachiatum* permitted lower incidence of black shank in 15% and one of the experiments the calyx dry weight yield was higher. Under greenhouse conditions, plants inoculated with *T. gamsii* and *T. longibrachiatum* had in 20 and 30% less incidence of *F. oxysporum* and *P. parasitica*, respectively. *Trichoderma* increased fresh and dry weight, also *T. gamsii* increased plant height. In general *T. gamsii* and *T. virens* increased height, fresh and dry weight in Roselle plants infected with *F. oxysporum*.

Keywords: *Trichoderma virens*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma gamsii*, Roselle.

2.3. INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) es de relevancia por los diversos usos potenciales que tiene. Su valor radica en los cálices que se aprovechan para la elaboración de bebidas no alcohólicas, jaleas, mermeladas y cosméticos (Mungole y Chaturvedi, 2011). Sin embargo, es afectado por diversos problemas fitosanitarios, entre los que destaca la “pata prieta”, enfermedad causada por *P. parasitica* (*P. parasitica* var. *nicotianae*) y *F. oxysporum* (Amusa *et al.*, 2005; Agbenin y Ogunlana, 2006), la cual se manifiesta por el necrosamiento del cuello y enseguida ataca a las raíces y la parte superior; como consecuencia de esta pudrición, en el follaje se produce clorosis y caída prematura de hojas (Hernández y Romero, 1990; Escalante-Estrada *et al.*, 2001). La incidencia de la “pata prieta” puede llegar hasta 40%. El principal control de los fitopatógenos, se realiza con la aplicación de agroquímicos (Pérez, 2004). En la actualidad se han intensificado los estudios sobre hongos y bacterias con efectos antagónicos a patógenos de plantas. Entre los microorganismos comúnmente empleados se encuentra *Trichoderma* (Fernández, 2001); debido a su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación, además de sus diversos mecanismos de control, como micoparasitismo, antibiosis, competencia por el espacio y nutrientes e inducción de resistencia (Harnan, 2006). A éste género también se le confiere la capacidad de funcionar como promotor de crecimiento (Cubillos-Hinojos, 2009). Su espectro antagónico es amplio y puede influir sobre diversos patógenos como *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Mycosphaerella fijiensis* y *Meloidogyne javanica* (Sempere *et al.*, 2007; Osorio *et al.*, 2009; Ha, 2010). El objetivo de esta investigación fue el evaluar la eficiencia biológica de *Trichoderma* spp. sobre la incidencia de la “pata prieta” en plantas de jamaica causado por *P. parasitica* y *F. oxysporum* en condiciones de campo e invernadero.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Localización del área de estudio y sitios de muestreos

El trabajo de campo se desarrollo en dos lotes ubicados en Xalpatlahuac, Municipio de Tecoaapa, Guerrero. El ensayo en invernadero se realizó en el Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGRO), ubicado en Cocula, Guerrero, México. Los patógenos *P. parasitica* y *F. oxysporum* se aislaron de plantas de jamaica con síntomas típicos de la “pata prieta”. *F. oxysporum* y se identificó con los las claves de Booth (1971) y Leslie y Summerell, (2006) y *P. parasitica* se identificó con las claves de Erwin y Ribeiro (1996).

Se evaluaron cuatro especies de *Trichoderma*: T6 (*T. virens*), T9 (*T. asperellum*), T13 (*T. gamsii*) y T19 (*T. longibrachiatum*), identificadas a nivel morfológico y molecular, previamente aislados en parcelas con cultivo de jamaica.

2.4.2. Preparación de inculo

F. oxysporum. Se sembró en tres cajas Petri con medio PDA, que se mantuvieron a 25⁰C durante ocho días. Una vez incrementado el inculó, se preparó el medio líquido papa-dextrosa. Se utilizaron matraces de 250 mL, en los que se pusieron 50 mL del medio, y se agregaron trocitos de raíz de plántulas de jamaica esterilizados en autoclave, por 15 min a una temperatura de 121°C, para prevenir una posible pérdida de virulencia del patógeno. Enseguida se colocaron en los matraces cinco rodajas con micelio de 1 cm de diámetro y se mantuvieron en agitación durante cuatro días, con el fin de inducir la producción de conidios.

P. parasitica. En cajas Petri con 20 mL de suelo en agua destilada estéril, se colocaron seis rodajas en medio de cultivo que contenían 1.5 cm de micelio activo de *P. parasitica* con

alternancia de exposición a la luz y la oscuridad (12h/12h). Las cajas Petri se incubaron a 25 °C por tres días, para la formación de esporangios y la posterior liberación de sus zoosporas, lo cual se logró después de poner los esporangios a 4 °C por media hora. Posteriormente, con la ayuda de un hematocitómetro, se ajustó una suspensión de zoosporas a una concentración de 1×10^4 mL⁻¹ (Escalante-Estrada *et al.*, 2001). Para el incremento de *Trichoderma* spp. se utilizaron bolsas de polipapel con capacidad de 2 kg con 400 g de olote, las cuales se llevaron a cabo bajo condiciones propuestas por Michel-Aceves *et al* (2008). Este material se utilizó para la inoculación de plantas en campo y invernadero.

2.4.3. Diseño experimental y análisis de datos

En campo, se utilizó un diseño de bloques al azar, con seis tratamientos (T9, T6, T13, T19, Testigo químico (TQ) (benomilo y azoxystrobin) y testigo sin inocular y cinco repeticiones. La unidad experimental consistió de parcelas de 7 surcos de 5 m de largo, 80 cm entre surcos y 80 cm entre plantas. Por otra parte, en invernadero se utilizó un diseño completamente al azar, con 20 repeticiones (calculadas con el programa Minitab 15, 2007) y seis tratamientos (T9, T6, T13, T19, *P. parasitica* o *F. oxysporum* y un testigo sin inocular) con un total de 120 unidades experimentales (una planta por maceta) para cada patógeno (*P. parasitica* y *F. oxysporum*). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), en el caso de la incidencia se efectuó la transformación arcoseno, la comparación de medias se realizó usando el método de Tukey (P<0.05), utilizando el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0.

2.4.4. Evaluación de *Trichoderma* spp. en condiciones de campo

Se seleccionaron dos lotes con antecedentes de la presencia de *P. parasitica* y *F. oxysporum*, este ensayo se estableció en otoño-invierno (2012). La siembra se realizó el 29 (lote “1”) y 30 (lote

“2”) de junio del 2012 y al mismo tiempo se inoculó con 7 g de olote cada uno de los especies de *Trichoderma*, y se determinó la concentración de conidios de cada uno, por cada 10 g de olote (T6: 1×10^3 ; T13: 1.4×10^3 ; T9: 6.3×10^5 ; T19: 2.5×10^5) y la segunda aplicación de llevó a cabo un mes después (16 y 17 de agosto) para esto se realizó una pequeña zanja alrededor al pie de la planta, donde se agregó 7 g de olote con crecimiento de *Trichoderma*, al mismo tiempo se aplico benomilo (0.5 kg ha^{-1}). El 2 de septiembre, se llevó a cabo la tercera inoculación de cada tratamiento; la misma fecha también, se aplicó el tratamiento químico (azoxystrobin) de acuerdo a la dosis recomendada del producto (2.5 L ha^{-1}) en las unidades experimentales correspondientes. La tercera inoculación de las cuatro especies de *Trichoderma*, se llevó a cabo el 18 y 19 de septiembre respectivamente.

2.4.5. Factores relacionados a la “pata prieta” en condiciones de campo

Se tomaron muestras de suelo, a las cuales se determinaron las características físicas y química en el Laboratorio Central Universitario en la Universidad Autónoma Chapingo. La humedad relativa y temperatura fueron registradas en una unidad de almacenamiento de datos (datalogger) Extech TH10 Temperature Data Logger USB®.

2.4.6. Evaluación de *Trichoderma* spp., sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum* en invernadero

Se utilizaron semillas criollas de jamaica, originarias de Tecoaapa, Guerrero; las cuales se desinfectaron con NaCl a 3% y se sembraron en macetas con peat moss con capacidad de 1 L. Después de 35 días de la siembra, las plantas de jamaica se inocularan con 7 g de olote con crecimiento de *Trichoderma* seleccionadas para este estudio (*T. asperellum*, *T. virens*, *T. gamsii* y *T. longibrachiatum*). Tres días después, se inoculó *P. parasitica* en la parte basal de la planta con 10 mL y una concentración de 1×10^4 de zoosporas mL^{-1} . Antes de inocular *F. oxysporum* se

cortó la punta de las raíces de las plantas para favorecer la infección, la cual contenía 5×10^6 de conidios mL⁻¹. Una vez inoculadas las plantas, se dejaron en condiciones de invernadero a una temperatura de 25 ± 2 °C, se regaron cada tercer día.

2.4.7. Variables evaluadas

En campo se evaluaron la incidencia (la incidencia se tomo tres veces, desde el momento de la observación de la presencia de plantas enfermas y cada 20 días hasta la cosecha 10 de diciembre, esto sirvió para obtener la incidencia acumulada); las variables altura, diámetro del tallo, peso fresco y seco del cáliz (rendimiento) al final del ciclo del cultivo (10 de diciembre). En condiciones de invernadero, las variables fueron incidencia (se avaluó a los 8 días después de la inoculación de cada patógenos), diámetro del tallo, altura de la planta, longitud de la raíz, peso fresco y seco de la planta de jamaica, estos últimos se tomaron después de los 65 días de la inoculación.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Factores relacionados a la pata prieta en condiciones de campo

La temperatura es uno de los factores relacionados con la presencia de “pata prieta” y éstas fueron calculadas cada mes desde junio hasta diciembre, las temperaturas máximas oscilaron entre 30 y 33 °C, las mínimas de 15 y 23 °C con un promedio de 25 °C (Figura 1). Se observó que la temperatura mínima y la temperatura promedio disminuyeron a través del tiempo, mientras que la temperatura máxima se mantuvo constante. Otro factor de relevancia fue la humedad relativa, la que fluctuó de 78 a 87% (Figura 1). Por otro lado, la “pata prieta” aumentó a través del tiempo (Figura 2), esto se le atribuye por los cambios en las temperaturas y la humedad relativa que se presentaron para esta enfermedad, además de la precipitación inestable

que también influyó en la incidencia de la enfermedad. En este sentido, Jacobi *et al.* (1983) reportaron que hay una correlación en la incidencia de *P. parasitica* var. *nicotianae* en tabaco contra la temperatura, la precipitación (condiciones adecuadas para los patógenos) y la sequía (estresa la planta).

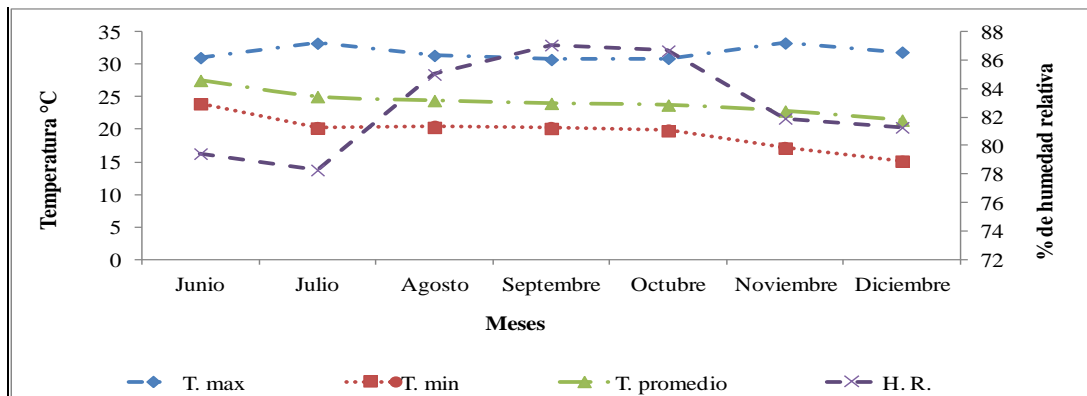


Figura 1. Datos promedios de temperatura máximos, mínimos, promedio y humedad relativa, de cada mes (2012). T. Max=Temperatura máxima, T. Min= Temperatura mínima, T. promedio= temperatura promedio, H. R.=Humedad relativa.

La temperatura y la humedad relativa son factores que impactan en el desarrollo de *Trichoderma*, como lo reportaron Infante *et al.* (2009) ya que las clamidosporas, presentan más de 75% de germinación, en condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28-30 °C), eventos similares se presentaron en este trabajo (Figura 1). Además, Papavizas (1985) indicó que los requerimientos nutrimentales de los hongos filamentosos son mínimos y su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, humedad y temperatura óptima de 25 a 30 °C. Otros autores como Widden y Scattolin (1988) y Jackson *et al.* (1991) mencionaron que se adapta y sobrevive en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad. En relación con los organismos patógenos, el suelo y la materia orgánica tienen una profunda influencia sobre éstos (Singh y Sachan, 2013). Por lo anterior, se determinaron las características del suelo en donde el pH y

textura fueron muy similares en los dos lotes (Cuadro 1), además se obtuvieron mayores cantidades de nutrientes en el lote 2; sin embargo, el lote 1 mostró mayor cantidad de materia orgánica. Kincaid *et al.* (1970), reportaron que el pH de suelo entre 5 y 6 y las altas cantidades de potasio se correlacionaron con la presencia de la “pata prieta” en tabaco causada por *P. parasitica* var. *nicotianae*. Estos resultados difieren con lo obtenido en este trabajo debido a que el pH de los suelos muestreados fue de 4.5 y la mayor cantidad de incidencia de la “pata prieta” se presentó en el lote 1, donde se detectó alta cantidad de potasio. Gallup *et al.* (2006), mencionaron que la pata prieta causada por *P. nicotianae* (*P. parasitica*) es favorecida por valores superiores a 6.2 y se suprime a valores de pH más bajos, además mencionaron que los valores de pH del suelo entre 5.5 y 6.0 proporcionan condiciones favorables de crecimiento para el tabaco, sin proporcionar condiciones favorables para *P. nicotianae*.

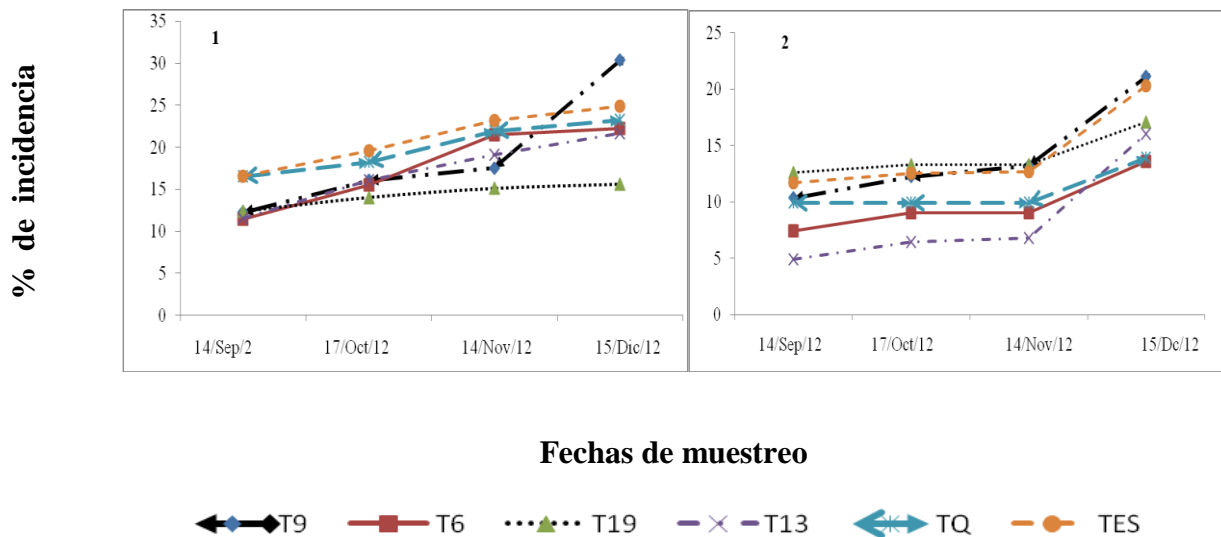


Figura 2. Porcentaje de la incidencia de la “pata prieta” en la jamaica en condiciones de campo, en dos lotes (1 y 2). T9 (*T. asperellum*), T6 (*T. virens*), T13 (*T. gamsii*), T19 (*T. longibrachiatum*), TQ (Tratamiento químico) y TES (Testigo-sin aplicar).

Cuadro 1. Valores de análisis de suelos de los lotes 1 y 2.

Lotes	pH	MO	N	P	K	Ca	Mg	Fe
		%	mgKg ⁻¹	mgKg ⁻¹	mgKg ⁻¹	mgKg ⁻¹	mgKg ⁻¹	mgKg ⁻¹
1	4.35	1.34	77.9	12.90	52	292	45	47.48
2	4.36	0.67	144.7	7.67	84	515	201	121.02

	Cu	Zn	Mn	B	Arena	Limo	Arcilla	Textura
	mgKg ⁻¹	mgKg ⁻¹	mgKg ⁻¹	mgKg ⁻¹	%	%	%	
1	0.46	0.21	5.87	0.51	70.2	8.0	21.8	FAA
2	5.10	1.54	37.41	0.42	52.2	22.0	25.8	FAA

MO: Materia orgánica, FAA: Franco arcilla arenosa.

2.5.2. Evaluación de *Trichoderma* spp., en condiciones de campo

Los resultados obtenidos en el lote 1 en la variable incidencia de la “pata prieta” mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) entre los tratamientos fluctuando de 15 a 33% (Cuadro 2). De acuerdo con lo anterior, se determinó que *T. asperellum* y el testigo (sin aplicar) fueron los tratamientos en los que la incidencia fue mayor (33.9 y 25 %). En el lote 2 no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con la misma variable, aunque las plantas tratadas con *T. virens* y *T. gamsii* fueron las que manifestaron menor incidencia en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 2). Nuestros resultados difieren a los reportados por Trillas *et al.* 2006, en la que indicaron que *T. asperellum* T-34 requiere la combinación con compostas y resulta más efectivo contra *Rhizoctonia solani*, al disminuir hasta el 29% su incidencia en plantas de pepino. Los estudios realizados en cultivo de ajo por Jiménez *et al.*, (2012) consignaron que

la combinación de *T. koningiopsis*, *T. harzianum* con acibenzolar-S-Metil, generó condiciones que favorecieron la reducción de la incidencia de *Sclerotium cepivorum*, además indujo a la productividad de la planta y por consiguiente el desarrollo y la defensa de las mismas. Estudios realizados en el cultivo de fresa se mencionó que la aplicación de *Trichoderma* spp. redujo la incidencia de *P. cactorum*, en 76.6%, en relación con el control sin tratar en el primer año de aplicación. Además, la solarización y aplicación de *Trichoderma* spp. único o combinados, redujeron la incidencia de la pudrición de un 30.8 a un 36.9%, en relación con el control sin tratar en 2 años de evaluación (Porrás *et al.*, 2007). Una de las observaciones novedosas en este estudio fue que la aplicación de *Trichoderma* aceleró la floración de la jamaica de 8 días, comparada con los tratamientos TQ y testigo.

Cuadro 2. Comparación de medias de las variables incidencia, altura de la planta, diámetro del tallo, fresco y seco del cáliz de plantas de jamaica, inoculadas con *Trichoderma* spp. en el lote 1.

Tratamientos	Incidencia %	Altura de la planta (cm)	Diámetro del tallo (cm)	Peso fresco del cáliz (kg)	Peso seco del cáliz (kg)
T9	33.97 a ^z	183.70 ab	1.44 a	9.32 a	1.260 a
T6	22.28 ab	191.84 a	1.54 a	10.78 a	1.331 a
T13	21.64 ab	182.70 ab	1.54 a	10.10 a	1.261 a
T19	15.58 b	176.42 ab	1.47 a	9.34 a	1.264 a
TQ	23.32 ab	175.00 ab	1.47 a	8.58 a	1.132 a
Testigo	25.05 ab	170.68 b	1.46 a	8.44 a	1.076 a

^zMedias dentro de cada columna seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05). T9 (*T. asperellum*), T6 (*T. virens*), T13(*T. gamsii*), T19 (*T. longibraquiatum*), TQ (Tratamiento químico) y Testigo (sin aplicar).

Así mismo, las variables altura, diámetro de la planta, peso fresco y seco del cáliz no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.07$) de los lotes evaluados (Cuadro 2 y 3). Al realizar comparaciones entre los dos lotes, el análisis de varianza de la prueba de F demostró que en la variable altura, peso fresco y seco del cáliz hubo diferencias significativas ($P \leq 0.0001$). Sin embargo, para el variable diámetro no hubo diferencias entre lotes ($P \leq 0.08$) (Cuadro 2 y 3)..

Cuadro 3. Comparación de medias de las variables incidencia, altura de la planta, diámetro del tallo, fresco y seco del cáliz de las plantas de jamaica, inoculadas con *Trichoderma* spp. en el lote 2.

Tratamientos	Incidencia %	Altura de la planta (cm)	Diámetro del tallo (cm)	Peso fresco del cáliz (kg)	Peso seco del cáliz (kg)
T9	14.24 a	193.40 a	1.34 b	6.64 a	0.872 a
T6	9.75 a	201.53 a	1.59 a	6.20 a	0.796 a
T13	8.53 a	203.43 a	1.41 ab	6.36 a	0.800 a
T19	14.06 a	200.06 a	1.47 ab	6.60 a	0.794 a
TQ	10.93 a	196.46 a	1.37 ab	6.10 a	0.770 a
Testigo	14.28 a	192.43 a	1.40 ab	6.10 a	0.749 a

^zMedias dentro de cada columna seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05). T9 (*T. asperellum*), T6 (*T. virens*), T13(*T. gamsii*), T19 (*T. longibrachiatum*), TQ (Tratamiento químico) y Testigo (sin aplicar).

Jabnoun-khiareddine *et al.* (2009), mencionaron que el cultivo de tomate inoculado con *T. harzianum*, *T. virens* y *T. viride* disminuyeron la incidencia provocada por *Verticillium* spp. incrementando el 50% del peso fresco de la raíz y peso del tallo. En el mismo sentido, estudios realizados por Okoth *et al.* (2011), mencionaron que *T. harzianum* combinados con triple superfosfato y nitrato amónico cálcico, incrementaron la germinación de la semilla del frijol y maíz, además que aumentó el diámetro del tallo, el crecimiento de la raíz y los brotes, también mencionaron que estas son variables que colaboran en la sobrevivencia de las plantas.

2.5.3. *Trichoderma* spp., como agente de control biológico de *P. parasítica* en plantas de jamaica en invernadero.

Las plantas de jamaica inoculadas con *P. parasitica*, presentaron síntomas característicos entre el cuarto y octavo día después de la inoculación, estos datos concuerdan con los reportados por Escalante-Estrada *et al.* (2001) cuando evaluaron 30 cepas de *P. parasitica* en plantas de jamaica, además mencionaron que el número de días de manifestación de los síntomas fue variable (11 a 22 días). También reportaron diferencias en el tamaño de las necrosis producidas por las cepas evaluadas. La variable incidencia de *P. parasitica* mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.0001$) de *T. gansii* (20%), *T. longibrachiatum* (30%) y *T. asperellum* (30%), produciendo disminución en la incidencia de *P. parasitica* en plantas de jamaica (Cuadro 4), y se atribuye a la acción de *Trichoderma* como un agente de biocontrol de diferentes fitopatógenos (Harman, 2006, Osorio *et al.*, 2011).

Hay estudios en otros cultivos y otros patógenos realizados por Hoyos-Carvajal *et al.* (2008) en la que reportaron que *T. asperellum* (T-21 y T-7) disminuyó la incidencia en 90% de *S. rolfisii* en semilleros de plantas de frijol, aunque no en el mismo porcentaje al obtenido en este trabajo. Sin embargo, estos resultados difieren con los obtenidos por Fernández-Herrera *et al.* (2007), al

evaluar cuatro productos biológicos comerciales de *Trichoderma* spp., de *Bacillus* y micorrizicos, pero no encontrar disminución de la incidencia contra *P. capsici* en plantas de jitomate, es decir que todas las plantas mostraron la enfermedad. Las variables diámetro de tallo, altura de la planta, peso fresco y seco de las plantas son los indicadores más importantes del vigor de las plántulas. En este estudio se observó diferencia significativa entre tratamientos, *T. asperellum* y *T. virens* fueron lo que destacaron en el incremento del diámetro del tallo (Cuadro 4), esto coincide con lo reportado por Azarmi *et al.* (2011) quienes evaluaron en plantas de tomate las mismas variables, y encontraron un incremento significativo mediante la aplicación de *T. harzianum* y *Trichoderma* sp (T969). La variable altura mostró diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) entre los tratamientos de las plantas tratadas con *T. longibrachiatum* y *T. virens*, las cuales destacaron en 6% y 3%, respectivamente (Cuadro 4).

Por otro lado, las plantas de jamaica, tratadas con *T. asperellum* y *T. virens* mostraron mayor diámetro de tallo (Cuadro 4), en comparación a los demás tratamientos. Las plantas tratadas con *T. gamsii* y *T. longibrachiatum* mostraron menor diámetro de tallo, es decir que la forma de respuesta entre especies fue diferente, estos datos concuerdan con los reportados por Azarmi *et al.* (2011). El peso fresco y seco de las plantas de jamaica presentó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($P \leq 0.0001$). Se destaca que las plantas inoculadas con *Trichoderma* aumentaron en 30% su peso fresco, mostrando su efecto en el peso fresco, mientras que *T. longibrachiatum* y *T. gamsii* aumentaron el peso seco en un 54.2%. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Hoyos-Cabral *et al.* (2008), quienes reportaron un incremento de 92% del peso seco del follaje, y en general de las estructuras aéreas de las plantas de papa inoculadas con dos cepas de *T. asperellum* (T-84 y T109), y contra *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. Ageeb y Mohamed (2012) evaluaron las mismas variables en

plantas de maíz inoculadas con *T. harzianun* T22 y encontraron un incremento del follaje en comparación con las plantas testigo. Así mismo, mencionaron que a medida que aumentaron las concentraciones de *Trichoderma* en el suelo, todas las variables de crecimiento se incrementaron.

Cuadro 4. Influencia de *Trichoderma* spp. en la incidencia, crecimiento y biomasa de plantas de jamaica (*Hibiscus sabdarrifa*) inoculadas con *P. parasitica* de 60 días de edad en invernadero.

Tratamientos	Incidencia (%)	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Longitud de la raíz (cm)	Peso fresco de la planta (g)	Peso seco de la planta (g)
<i>P. parasitica</i>	45 a ^z	84.92 ba	0.52 ba	21.38 a	10.81 b	2.80 c
T9 + <i>P. par</i>	30 c	77.03 bc	0.57 a	21.85 a	15.16 ba	5.16 cb
T6 + <i>P. par</i>	40 b	87.50 ba	0.58 a	17.07 a	15.76 ba	5.02 cb
T19 + <i>P. par</i>	30 c	90.65 ba	0.51 ba	23.50 a	14.24 ba	6.05 b
T13 + <i>P. par</i>	20 d	56.52 c	0.54 ba	21.36 a	16.59 ba	6.18 b
Testigo	0 e	104.17 a	0.45 b	46.01 a	18.59 a	9.42 a

^zMedias dentro de cada columna seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05). *P. par* (*P. parasitica*), T9 (*T. asperellum*), T6 (*T. virens*), T13 (*T. gamsii*), T19 (*T. longibrachiatum*) y Testigo (agua).

2.5.4. *Trichoderma* spp., como agente de control biológico de *F. oxysporum* en plantas de jamaica en invernadero.

F. oxysporum es un hongo cosmopolita que existe en una gran diversidad de formas patogénicas (Ploetz, 2006). Al inocular *F. oxysporum* en plantas de jamaica se observaron plantas cloróticas y achaparradas. Resultados similares fueron observados por Ploetz y Palmateer (2007), también observaron necrosamiento y marchitamiento generalizado en las plantas de jamaica. Estos resultados son diferentes con los obtenidos por Sylvère *et al.* (2011) que evaluaron dos variedades de jamaica (*sabdariffa* y *altissima*) y encontraron que *sabdariffa* es resistente al ataque de *F. oxysporum*, que se atribuye a la cantidad de compuestos fenolicos que contiene, comparada con la variedad *altissima*. Sin embargo, los resultados difieren a los obtenidos por Amusa *et al.* (2005) quienes mencionaron que *F. oxysporum* es el principal agente causal de la “pata prieta” en plantas de jamaica, con incidencia de 26% de plantas examinadas en campo.

En la variable altura se observó diferencia significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.0001$), de los cuales destacan *T. gamsii* que aumentó en un 3.1 %. El testigo mostró diferencias entre los tratamientos en todas las variables evaluadas (Cuadro 5), la cual se atribuye a que *F. oxysporum* tiene una clara influencia negativa en crecimiento de las plantas de jamaica, en comparación con las no inoculadas (Agbenin y Ogunlana 2006). El diámetro del tallo y la longitud de la raíz no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.14$), por lo que estas variables no determinan la influencia de *Trichoderma* en el control del patógeno. Donoso *et al.* (2008) y Jiménez *et al.* (2011), indicaron que la aplicación de *T. harzianum* en semillero o en el transplante, puede causar incremento en el crecimiento de plantas de tomate y en el desarrollo del sistema radical, debido a la producción de compuestos secundarios que estimulan y aumentan la capacidad de las raíces para aprovechar los nutrientes. Además, Benítez *et al.* (2004) y Torres

et al. (2008) reportaron que este mejoramiento en el desarrollo de la planta y las raíces puede favorecer el control de hongos causantes de enfermedades. El peso fresco y peso seco de la planta evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.0001$), de las que destacan *T. virens*, *T. gamsii* y *T. longibrachiatum* (Cuadro 5). Resultados similares fueron consignados por Badar y Qureshi, (2012) al indicar que *T. hamatum*, solo y combinado con cepas de *Rhizobium* incrementó el crecimiento en plantas de girasol, mejorando su raíz, longitud de brote y biomasa.

Cuadro 5. Medias obtenidas de influencia de la aplicación de *Trichoderma* spp. en el crecimiento, biomasa e incidencia de *F. oxysporum* en plantas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) de 60 días de edad en invernadero.

Tratamientos	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Longitud de la raíz (cm)	Peso fresco de la planta (g)	Peso seco de la planta (g)
<i>F. oxysporum</i>	55.22 cb ^z	5.00 a	26.60 b	17.11 ba	3.32 b
T9 + F.oxo	44.08 d	4.45 a	24.40 b	12.73 c	2.87 b
T6 + F.oxo	54.98 cb	4.95 a	26.35 b	15.80 bc	2.95 b
T19 + F.oxo	47.14 cd	4.85 a	23.20 b	14.77 bc	4.06 ba
T13 + F.oxo	57.13 b	5.15 a	26.75 b	15.69 bc	3.55 b
Testigo	76.33 a	4.95 a	32.30 a	20.62 a	5.19 a

^zMedias dentro de cada columna seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05). F. oxy (*Fusarium oxysporum*), T9 (*T. asperellum*), T6 (*T. virens*), T13 (*T. gamsii*), T19 (*T. longibrachiatum*) y Testigo (agua).

2.6. CONCLUSIONES

Las plantas tratadas con *T. longibrachiatum* mostraron menor (15%) incidencia de la pata prieta y en uno de los lotes el peso del cáliz seco fue mayor en la producción del campo. La evaluación en invernadero, *T. longibrachiatum* y *T. gamsii* disminuyeron en 20 y 30% la incidencia de *P. parasitica* y aumentaron el peso fresco y seco de la planta. En las plantas infectadas con *F. oxysporum*, la inoculación de *T. virens* y *T. gamsii* aumentó su altura, peso fresco y seco de la planta.

2.7. LITERATURA CITADA

- Agbenin, N. O, M. O, Ogunlana. 2006. Occurrence of *Fusarium* wilt and nematodes on red calyx roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Northern Nigeria. *Journal of Plant Protection Research*, 46: 117-121.
- Ageeb, A. S., S. Mohamed. 2012. Application of *Trichoderma harziunum* T22 as a biofertilizer supporting maize growth. *African Journal of Biotechnology*, 11: 8672-8683.
- Amusa, N. A., A. A. Adegbite, M. O. Oladapo. 2005. Vascular wilt of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) in the humid forest region of South-western Nigeria. *Plant Pathology Journal* 4: 122-125.
- Azarmi, R., B. Hajieghrari and A. Giglou. 2011. Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology*, 10:5850-5855.
- Badar, R, and S. A. Qureshi. 2012. Use of *Trichoderma hamatum* alone and in combination with *Rhizobial* isolates as biofertilizer for improving the growth and strength of sunflower. *Journal of Basic and Applied Scientific Research* 2:6307-6314.
- Benítez, T. A., M. L. Rincón and A. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute. Kew, Surrey, United Kingdom. 237 p.
- Cubillos-Hinojosa, J., N. Valero y L. Mejía. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía colombiana* 27: 81-86.

- Donoso, E., G. Lobos y N. Rojas. 2008. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero. *Bosque* 29:52-57.
- Erwin, D. C. and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- Escalante-Estrada, Y. I., S. Osada-Kawasoe y J. A. Escalante-Estrada. 2001. Variabilidad patogénica de *Phytophthora parasitica* D., en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:84-89.
- Fernández, L. V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 62: 96-100.
- Fernández-Herrera, E., M. Acosta-Ramos, F. Ponce-González y V. Manuel-Pinto. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. Y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:35-42.
- Gallup, C.A., M. J. Sullivan and H. D. Shew. 2006. Black Shank of Tobacco. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0717-01. Consultado el 11/09/12 <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Oomycetes/Pages/BlackShank.aspx>.
- Gruber, S. y V. Seidl-Seiboth. 2012. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* 158:9-26.
- Ha, T. N. 2010. Using *Trichoderma* species for biological control of plant pathogens in viet nam. *J. Issaas*. 16:17-21.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Hernández, M. J. y C. S. Romero. 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* 67: 50-54.
- Hoyos-Carbajal, L., M. S. Jaramillo V., y S. Orduz P. 2008. Evaluación de *Trichoderma asperellum* como biorregulador de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 61: 4496-4502.
- Infante, D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 24:14-21.
- Jabnoun-Khiareddine, H., M. Daami-Remadi, F. Ayed, and M. El Mahjoub. 2009. Biological control of tomato *Verticillium* wilt by using indigenous *Trichoderma* spp. *The african journal of plant science and biotechnology* 3: 26-36.
- Jackson, A.M., J. M. Whipps y J. M. Lynch. 1991. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 494-501.

- Jacobi, W. R., C. E. Manin and N. T. Powel. 1983. Influence of temperature and rainfall on the development of tobacco black shank. *Phytopathology* 73:139-143.
- Jiménez, C., N. Sanabria de Albarracín, G. Altuna y M. Alcano. 2011. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). *Rev. Fac. Agron.* 28:1-10.
- Jiménez, M., A., A. Asdrubal, D., Ulacio y A. Hernández. 2012. Evaluación de *Trichoderma* spp. y Acibenzolar-S-Metil (Bion®) como inductores de resistencia a la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones de campo. *J. Selva Andina Res. Soc.* 1:14-25.
- Kincaid, R. R., F. G. Martin, N. J. Gammon, H. L. Breland and W. L. Pritchett. 1970. Multiple regression of tobacco black shank, root knot, and coarse root index on Soil pH, potassium, calcium, and magnesium. *Phytopathology* 60:1513–1516.
- Leslie, J. F. and B. A. Summerell. 2006. *The Laboratory Fusarium. Manual.* Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Michel-Aceves, A. C., M. A. Otero-Sánchez, R. D. Martínez-Rojero, N. L. Rodríguez-Morán, R. Ariza-Flores y A. Barrios-Ayala. 2008. Producción Masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en Diferentes Sustratos Orgánicos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14:185-191.
- Mungole, A. y A., Chaturvedi. 2011. *Hibiscus sabdariffa* L. a rich source of secondary metabolites. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 6:83-87.
- Okoth, S. A., J. A. Otadoh and J. O. Ochanda. 2011. Improved seedling emergence and growth of maize and beans by *Trichoderma harziunum*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13: 65-71 65.
- Osorio, H. E., F. D. Hernández-Castillo, G. Gallegos-Morales¹, R. Rodríguez-Herrera and F. Castillo-Reyes. 2011. *In-vitro* behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian. *African Journal of Agricultural Research* 6:4594-4600.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 23: 23-54.
- Pérez, C. J. 2004. Agricultura ecológica: una alternativa al desarrollo sustentable en el campo mexicano. *El Cotidiano* 20: 95-100.
- Ploetz, R. C. 2006. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology* 96:648-652.
- Ploetz, R. C. y A. J. Palmateer. 2007. First Report of Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* on Roselle in the United States. *Plant Disease* 91: 639.
- Porrás, M., C. Barrau, F. T. Arroyo, B. Santos, C. Blanco and F. Romero. 2007. Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma* spp. and soil solarization. *Plant Disease* 91:142-146.

SAS OnlineDoc® 9 Copyright © 2002. SAS Institute Cary, NC, USA.

- Segarra, G., E. Casanova, M. Avilés y I. Trillas. 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for Iron. *Microbial Ecology* 59:141-149.
- Sempere, F. and M. P. Santamarina,. 2007. *In vitro* biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler Ander different environmental conditions. *Mycopathologia* 163:183-90.
- Singh, R. and N. S. Sachan. 2013. Review on biological control of soil borne fungi in vegetable crops. *Hortflora Research Spectrum* 2:72-76.
- Sylvère, S. R., G. Charles, H. Atta, D., D. Koné, Y. Toueix, Y. Djè, and M. Branchard. 2011. Breeding of *Hibiscus sabdariffa* L.: evaluation of resistance to *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend. Snyd. and Hans in two varieties. *Agric. Biol. J. N. Am.* 2:125-133.
- Torres E., J. Iannacone y H. Gómez. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia* 67:169-178.
- Trillas, M. I., E. Casanova, L. Cotxarrera, J. Ordovás, C. Borrero, and M. Avilés. 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biological Control* 39:32-38.
- Widden, P. y V. Scattolin.1988. Competitive interactions and ecological strategies of *Trichoderma* species colonizing spruce litter. *Mycologia* 80:795-803.

CAPÍTULO III

Antagonismo *In Vitro* de quitinasas y glucanasas producidas por *Trichoderma* spp., sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*

Eduardo **Osorio-Hernández**^{1*}, Javier **Hernández-Morales**¹, Víctor **Conde-Martínez**¹, Alejandro Casimiro **Michel-Aceves**², Juan **Cibrián-Tovar**¹, Humberto **Vaquera-Huerta**¹.

¹ Colegio de Postgraduados. 56230, Montecillo, Estado de México. osorio-5@hotmail.com.

²Centro de Estudios Profesionales del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, Av. Vicente Guerrero No. 81, C. P. 40000. Colonia Centro. Iguala, Guerrero, México.

3.1. RESUMEN

Las especies de *Trichoderma* son productoras de las enzimas quitinasas y glucanasas, mismas que han mostrado efecto inhibitorio micelial en diferentes fitopatógenos. El objetivo fue evaluar el efecto de quitinasas y glucanasas de *Trichoderma* spp. contra *P. parasitica* y *F. oxysporum*. Estas enzimas fueron producidas por *T. asperellum*, *T. virens*, *T. gamsii* y *T. longibrachiatum*. Para la producción óptima de las dos enzimas, cada especie se incubo en medio líquido estéril, a cada medio se les inoculo 1×10^6 conidios y se puso en agitación durante 5 días para quitinasas y 8 días para glucanasas. Posteriormente se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante, después se filtraron en papel Whatman no. 1. Los filtrados se utilizaron para la cuantificación de proteínas, la determinación de N-acetilglucosamina por la actividad enzimática de quitinasas y su respectiva actividad específica, el otro se utilizó la determinación de glucosa por la actividad de glucanasas y su respectiva actividad específica. Para quitar las impurezas los medios de cultivo con quitinasas y glucanasas se pasaron por millipore de 0.22 μm , para quitar las impurezas y se ajustaron a un volumen de 1:1 con medio PDA previo a solidificarse. *T. longibrachiatum* fue la que mostro mayor actividad enzimática y específica tanto para quitinasas y glucanasas. Las

glucanasas producidas por *T. longibrachiatum* mostraron hasta un 40 % de inhibición micelial en *F. oxysporum* (4.8 cm). Las quitinasas de *T. longibrachiatum* mostraron un 15 % de efecto inhibitorio en *P. parasitica* (6.7 cm) y un 45 % para *F. oxysporum* (4.4 cm).

Palabras clave: Antibiótico, control biológico, enzimas, fitopatógenos.

3.2. ABSTRACT

Trichoderma species are producers of chitinase and glucanase enzymes, which have demonstrated inhibitory effect on mycelial different pathogens. The objective was to evaluate the effect of chitinases and glucanases of *Trichoderma* spp. against *P. parasitica* and *F. oxysporum*. These enzymes were produced by *T. asperellum*, *T. virens*, *T. longibrachiatum* and *T. gamsii*. For optimal production of the two enzymes, each species was placed in sterile liquid medium, which were 1×10^6 conidia inoculum and began to stir for 5 days for chitinases and 8 days glucanases. They were then centrifuged and the supernatant was recovered, then filtered in Wattman paper number 1. The filtrate was used for quantification of proteins, determination of N-acetylglucosamine by the enzymatic activity of chitinases and their respective specific activity and also the determination of glucose by the activity of glucanases. Culture media with chitinases and glucanases millipore filtered through 0.22 mm, to remove impurities and adjusted to a volume of 1:1 with PDA medium prior to solidification. *T. longibrachiatum* was the one that showed higher enzyme activity and specified in chitinases and glucanases. Glucanases produced by *T. longibrachiatum* showed 40% inhibition of mycelial *F. oxysporum* (4.8 cm). Chitinases of *T. longibrachiatum* showed 15% inhibitory effect on *P. parasitica* (6.7 cm) and at 45% for *F. oxysporum* (4.4 cm), respectively.

Keywords: Antibiotic, biological control, enzymes, plant pathogens.

3.3. INTRODUCCIÓN

Phytophthora parasitica y *Fusarium oxysporum* son capaces de infectar una amplia gama de especies de plantas y pueden causar daños significativos a las plantas cultivadas económicamente importantes en todo el mundo (Leslie y Summerell, 2006; Martin *et al.*, 2014). A la fecha, el manejo de estos fitopatógenos se ha realizado a través del control químico (Pérez, 2004); sin embargo, algunos aislados de *P. parasitica* y *F. oxysporum* han mostrado resistencia a diversos fungicidas (Ferrin y Wadsworth, 1992; Lucas *et al.*, 2008). Por lo anterior, hay una búsqueda de alternativas biológicas para el control de enfermedades de plantas que no afecten a la salud humana ni el medio ambiente (Anitha and Rabeeth, 2010). Una de estas, es el uso de hongos antagonistas, tales como *Trichoderma* debido a su versatilidad, adaptabilidad y facilidad de manejo, además de sus diferentes mecanismos de acción, tales como micoparasitismo, antibiosis, competencia por el espacio y nutrientes e inducción de resistencia en plantas contra patógenos (Howell, 2003; Mukherjee *et al.*, 2013). Las especies de *Trichoderma* son ampliamente utilizadas en la agricultura y en la industria como biopesticidas y fuentes de enzimas de efecto antibiótico. *Trichoderma* spp., produce diversos enzimas como quitinasas, glucanasas, celulasas, proteasas y amilasas (De marco *et al.*, 2003, Gonzalez *et al.*, 2012). Las enzimas quitinolíticas y β -glucanasas de *Trichoderma* spp., desempeñan un papel importante en el micoparasitismo entre *Trichoderma* spp. desempeñan un papel importante de micoparasitismo con los fitopatógenos. Se demostró que la quitinasa 46-kDa (CHIT 46) de *Trichoderma* afectó drásticamente, las paredes celulares de *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* en condiciones *In Vitro* (Lima *et al.*, 1999); además, se reportó una proteasa con efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *P. parasitica* y *F. oxysporum* (Budi *et al.*, 2000). *Trichoderma* puede parasitar las hifas del hongo fitopatógeno provocando enrollamientos,

ganchos y apresorios, que penetran la pared celular por la acción hidrolítica de las enzimas quitinasas y glucanasas (Zeilinger y Omann, 2007). Lo anterior es debido a que las estructuras de las paredes celulares de los hongos están constituidas casi exclusivamente de polisacáridos, como quitinas y glucanos (Kucuk y Kivanc, 2004). Con base a por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar las actividades enzimáticas de las quitinasas y glucanasas producidas por cuatro especies de *Trichoderma* y evaluar el efecto antibiótico que presenta en el crecimiento micelial de *P. parasitica* y *F. oxysporum*.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Ubicación del ensayo y material biológico utilizado

El trabajo se realizó en el laboratorio de bioquímica del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México. Los patógenos *P. parasitica* y *F. oxysporum* se aislaron de plantas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) con síntomas típicos. *P. parasitica* se identificó con las claves de Erwin y Ribeiro (1996) y *F. oxysporum* se identificó con las claves de Booth (1971) y Leslie y Summerell (2006).

Se evaluaron cuatro especies de *Trichoderma*: T6 (*T. virens*), T9 (*T. asperellum*), T13 (*T. gamsii*) y T19 (*T. longibrachiatum*), previamente identificadas por Esparza-Luna (2009) a nivel morfológico y molecular, aislados de parcelas cultivadas con jamaica. Los microorganismos utilizados se encuentran en el cepario del instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados.

3.4.2. Extracción y purificación de quitinasas y glucanasas de *Trichoderma* spp.

Cada especie de *Trichoderma* se creció en medio líquido para la producción de quitinasas y glucanasas, según la metodología propuesta por Harman *et al.* (1993) y Worasatit *et al.* (1994).

En matraces Erlenmeyer de 500 ml se colocaron 200 ml de medio de cultivo preparado con 10 g de KNO₃; 5 g de KH₂PO₄; 2.5 g de MgSO₄/H₂O; 2 mg de FeCl₃; 150 ml de jugo V8; 10 g de polivinilpirrolidona y se ajustó a 1000 ml con agua desionizada. A cada medio se le adicionó el 1 % (p:v) de quitina en hojuelas ó el 0.1% (p:v) de laminarina para inducir la producción de quitinasas y glucanasas respectivamente. 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 en una concentración final de 1 x 10⁶ por ml de las cuatro especies de *Trichoderma*, se incubaron a 25 °C, 12 h luz/oscuridad en un agitador rotatorio a 180 rpm durante 5 días para la producción de quitinasas y 8 días para glucanasas. Transcurrido este tiempo de incubación, el medio de cultivo con las enzimas de interés se separaron de su biomasa con papel filtro Whatman No. 1; enseguida se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 min (Hadar *et al.*, 1979), el sobrenadante se utilizó (20 ml) para determinación cuantitativa de quitinasas y glucanasas; el sobrante se utilizó para las pruebas de inhibición, con previo filtrado a través de filtro millipore 0.22 µm (Millex®).

3.4.3. Cuantificación de quitinasas producida *Trichoderma* spp.

Se marcaron cuatro tubos “A”, “B”, “C” y “D” con 3 repeticiones para cada tubo. Se les agregó 1 ml de medio de cultivo filtrado, y 3.8 mg de quitina purificada en 1 mL de amortiguador McIlvaine de citratos pH 5.0. Enseguida, los tubos “A” se sumergieron en agua en ebullición por 10 min (para desnaturalizar la enzima). Posteriormente, todos los tubos se incubaron por 24 h a 37°C en baño María. Después de 24 h se tomó una alícuota de 0.5 ml de cada tubo (A-D) y se depositó en tubos de ensaye. Todos los tubos se colocaron en agua hirviendo por 10 min. Después de este tiempo, a cada tubo se le agregó 0.1 ml de solución de tetraborato de potasio (0.8 M) y se volvió a poner en agua en ebullición por 5 min. Enseguida se incubó por 20 min a 36-38°C y enseguida se dejó enfriar, a cada tubo se le agregó 3 ml de p-

diametillaminobenzaldehido (DMAB) (10 g de DMAB disueltos en una mezcla de 12.5 ml de HCl 10 N y 87.5 ml de ácido acético glacial, se almacenó a 2°C; para posteriormente diluir 1:10 en adición de ácido acético glacial antes de utilizarse). Los tubos se agitaron en un vortex por 1 min y la absorbancia de cada tubo se midió a 544 nm en un espectrofotómetro (JENWAY 6305) y se utilizó agua destilada como blanco, la cual se le realizó el mismo procedimiento que a las muestras.

La curva de calibración de la N-acetilglucosamina se realizó con las concentraciones 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 µg/2 ml en amortiguador McIlvaine de citratos con pH 5.0 (Figura 3). Enseguida, a cada tubo se le agregó 0.1 ml de solución 0.8 M de tetraborato de potasio y se puso en ebullición por 5 min. Posteriormente se incubó en baño maría por 20 min a 36-38°C. Pasado ese tiempo se dejó enfriar durante 15 min en hielo y a cada tubo se le agregó 3 ml de p-diametillaminobenzaldehido (DMAB) (10 g de DMAB disueltos en una mezcla de 12.5 ml de HCl 10 N y 87.5 ml de ácido acético glacial, se almacenó a 2°C; posteriormente se diluyó 1:10 con ácido acético glacial, este se preparó horas antes de utilizarse). Los tubos se homogenizaron en un vortex por 1 min y la absorbancia de cada tubo se midió a 544 nm en un espectrofotómetro (JENWAY 6305). Se utilizó un tubo blanco (agua destilada) la cual se le realizó el mismo procedimiento que a las muestras. Para establecer la actividad de N-acetilglucosamina por extrapolación de la gráfica estándar se tomaron las diferencias en las lecturas de absorbancia del tubo "A" menos el promedio de los tubos B-D. La actividad de N-acetilglucosamina de cada filtrado se calculó con cuatro replicas de análisis. Las variables utilizadas fueron la actividad total (AT) y específica (AE) de las quitinasas. La AT y AE de las quitinasas se determinó por cantidad de N-acetilglucosamina liberada; la AT, se expresó en µmoles de N-acetilglucosamina/hora y la AE, en µmoles de N-acetilglucosamina/mg de

proteína/hora de acuerdo con Hadar *et al.*, (1979) y se utilizó la formula reportada por Gonzalez *et al.*, (2012) para el cálculo de AT y AE. El contenido de proteínas del extracto enzimática se determinó con el método de Bradford *et al.*, (1976) (Figura 4).

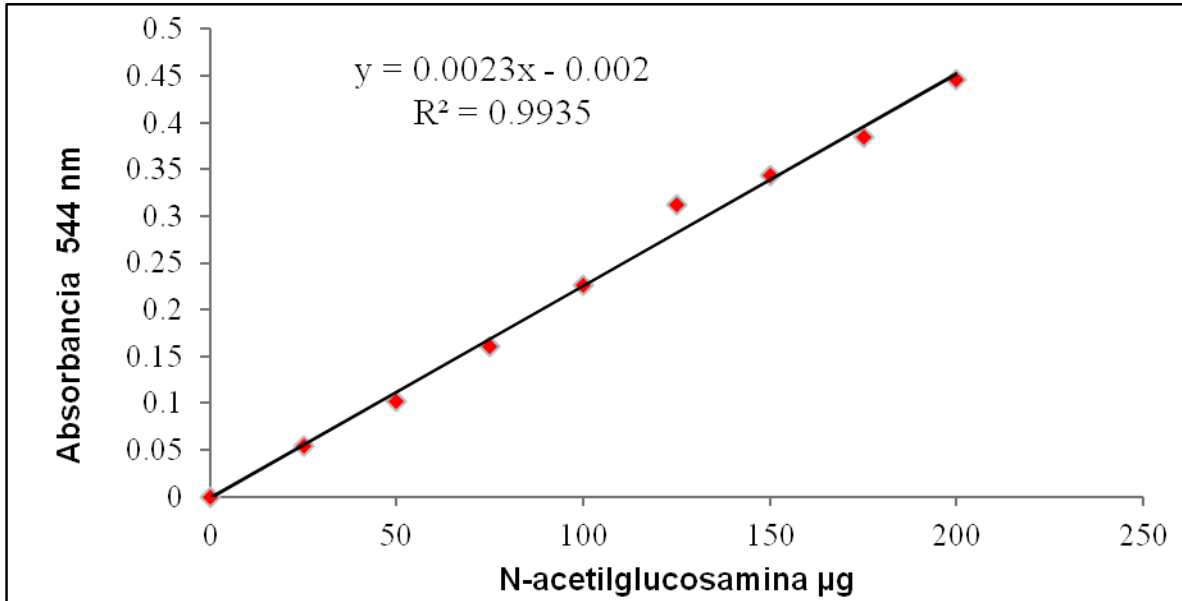


Figura 3. Curva de calibración de N-acetilglucosamina para deteminacion de quitinasas.

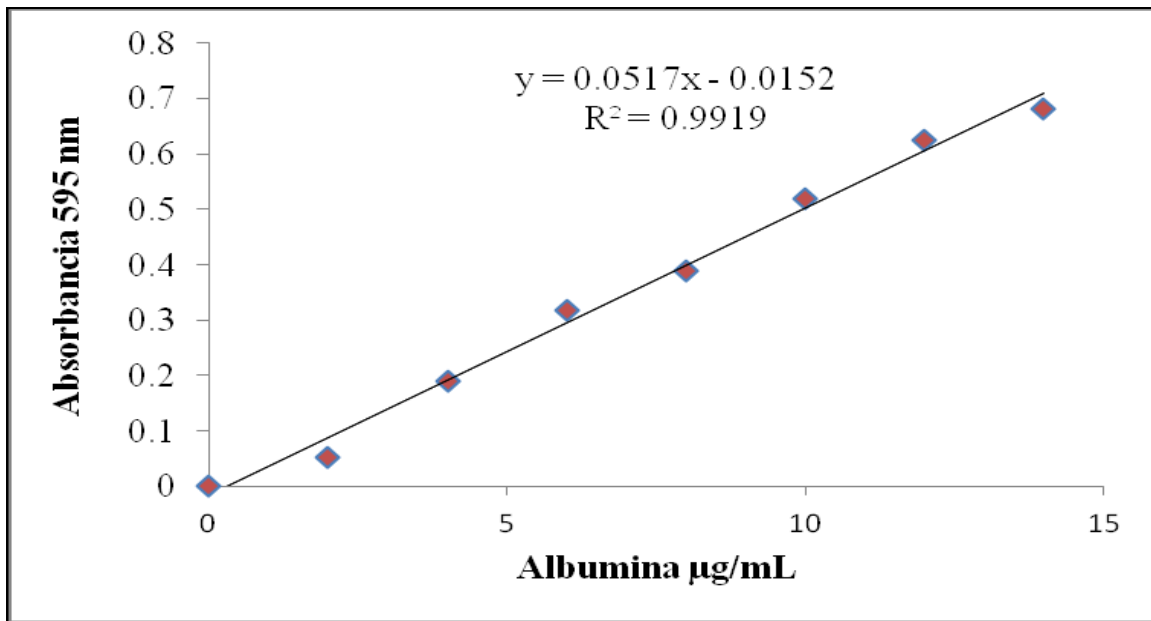


Figura 4. Curva de calibración Albumina Sérica Bovina (BSA) para cuantificación de proteínas

3.4.4. Cuantificación de glucanasas producidas por las diferentes cuatro especies de *Trichoderma*

La producción de las glucanasas se determinó de acuerdo al método de Nelson (1944) y Somogyi (1952), para ello se utilizaron los filtrados obtenidos de las cuatro especies de *Trichoderma* del medio de cultivo líquido 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 mg/ml de laminarina en solución 0.1 M de amortiguador de citrato pH 5.0 (0.1 M de citrato de sodio y 0.1 M de ácido cítrico, mezclados en proporción 21:29 (v/v), respectivamente). Solo a los tubos “X” se le agregó 250 µl del filtrado del cultivo y se incubaron todos los tubos 4 h a 40 °C en baño María.

Después de la incubación, a los tubos “Y” se les agregó 250 µl del filtrado, enseguida se adicionaron a todos los tubos 2 ml de reactivo de cobre (RC) e inmediatamente se detuvo la reacción por inmersión de los tubos en agua en ebullición 10 min para destruir la actividad enzimática. Posteriormente 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, después se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (JENWAY 6305). El mismo procedimiento se hizo con un blanco, pero en lugar del filtrado de las cepas se utilizó agua destilada y desionizada (Bruce *et al.*, 1995).

El RC se preparó minutos antes de utilizarlo estuvo compuesto por el reactivo Cu I y del reactivo Cu II (4:1). El Cu I se estuvo ompuesta 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 Na_2CO_3 , 16 g de bicarbonato de sodio NaHCO_3 , 80.44 g de sulfato de sodio Na_2SO_4 y 800 ml de agua. El reactivo II se constituyo con 4 g de sulfato de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 36 g de sulfato de sodio Na_2SO_4 y 200 ml de agua. En ambos reactivos los componentes se calentaron hasta disolver y después, ya frios, 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 H_2SO_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 (Bruce *et al.*, 1995) y se incubó a 37 °C por 2 días. La curva de calibración se realizó con las siguientes concentraciones de glucosa de: 50, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g}/2$ ml. Las diferencias en las lecturas de absorbancia (X-Y) se utilizaron para establecer la actividad de glucanasas por extrapolación de la gráfica estándar (Fig. 5). La actividad de las glucanasas de cada filtrado se calculó con cuatro réplicas de análisis (Bruce *et al.*, 1995). La actividad de glucanasa se determinó por la cuantificación de glucosa. La actividad específica se expresó en μmoles de glucosa/mg de proteína, de acuerdo con Hadar *et al.*, (1979) y Madi *et al.*, (1997). Las variables utilizadas para cuantificar la actividad de las glucanasas fueron la AT y AE, la cual se calculó por medio de la fórmula reportada por Gonzalez *et al.*, (2012).

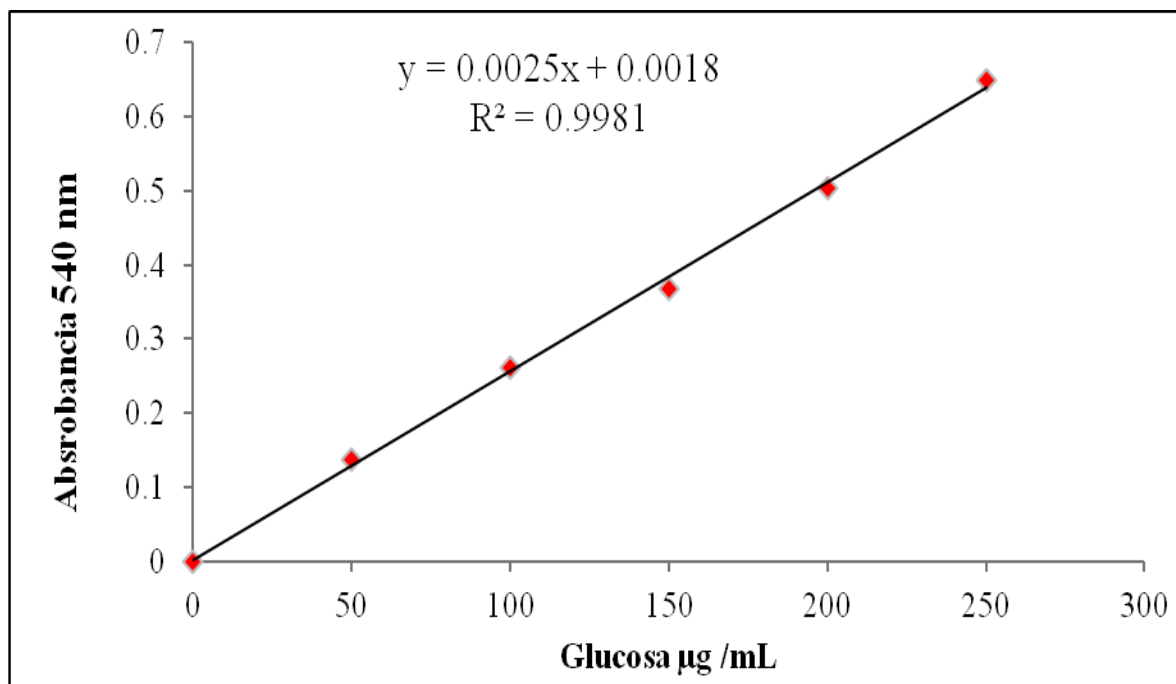


Figura 5. Curva de calibración de glucosa, para cuantificación de actividad de glucanasas.

3.4.5. Evaluación antibiótica de quitinasas y glucanasas producidas por *Trichoderma* sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum*.

Parte del filtrado obtenido de los medios de cultivo enzimático (quitinasas o glucanasas, según fue el caso) se pasaron por filtro millipore (Millex®) de 0.22 µm y se tomaron 10 ml de este filtrado de cada uno de las especies de *Trichoderma*, el cual se mezcló en proporción 1:1 (v:v) con medio en PDA previo a solidificar. Cada caja Petri se inoculó con un disco de 5 mm de diámetro de PDA con micelio de 10 días en crecimiento activo de *P. parasitica* o de *F. oxysporum* y se incubaron a 25 °C durante 8 días. Como testigo se utilizaron cajas Petri con medio PDA y agua destilada estéril (Madi *et al.*, 1997). Con una regla graduada se midió el diámetro del crecimiento de los patógenos, expresado en cm, este crecimiento se registró cada dos días hasta que se llenó la superficie de la caja Petri (5 días a *F. oxysporum* y 7 días a *P. parasitica*). Los datos se expresaron en cm del crecimiento micelial. El número de conidios producidos por *F. oxysporum* en cada tratamiento se cuantificó en la cámara de Neubauer colocando 10 discos de 0.5 cm de diámetro de la colonia en crecimiento de 12 días de edad en 10 ml de agua destilada estéril; expresándose los resultados en número de conidios por caja. En la cuantificación del porcentaje de germinación de las unidades formadoras de colonias (UFC) se inocularon conidios en cajas Petri con medio PDA y las UFC germinadas se contabilizaron 48 h después.

3.4.6. Diseño estadístico y análisis de datos

Se utilizó un diseño completamente al azar, con 9 tratamientos (4 quitinasas y 4 glucanasas + el testigo) con cinco repeticiones de cada patógeno (*P. parasitica* y *F. oxysporum*). Las variables respuestas fueron el crecimiento micelial, número de conidios y número de UFC. Se realizó el

análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre tratamientos y la comparación medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con el programa SAS.

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1. Cuantificación de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp.

Diversos estudios han demostrado que *Trichoderma* spp. secreta enzimas hidrolíticas como quitinasas y glucanasas, con capacidad de degradar la pared celular y penetrar el micelio de los hongos fitopatógenos (González *et al.*, 2012). En este trabajo las cuatro cepas evaluadas de *Trichoderma* mostraron la capacidad de producir quitinasas y glucanasas en menor o mayor grado. En general la actividad enzimática de las quitinasas fluctuó entre 0.107 y 0.228 μmol de N-acetilglucosamina y la actividad específica varió de 0.102 y 0.255 $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de N-acetilglucosamina de proteína/min. El análisis estadístico detectó diferencias significativas ($P \leq 0.005$) entre las especies evaluadas tanto en actividad enzimática como en actividad específica de quitinasas producidas por *Trichoderma* spp (Cuadro 6). La especie con mayor actividad enzimática y específica fue *T. longibrachiatum*; estos resultados son similares a los reportados por Michel-Aceves *et al.*, (2005), encontraron actividad de quitinasas en cepas de *T. harzianum*. En el mismo sentido Gonzalez *et al.* (2010) y Bruce *et al.* (1995), mencionaron que la producción de quitinasas difieren entre especies, depende del medio de cultivo utilizado y los días de la evaluación de las enzimas, estos mismos autores mencionaron que la variabilidad encontrada entre las actividades enzimáticas de quitinasas son un indicativo de la utilidad en la selección de los aislamientos de *Trichoderma* como agentes de control biológico.

Cuadro 6. Producción de quitinasas por cepas de *Trichoderma* spp.

Tratamientos	Actividad enzimática (μmol de N-Acetil glucosamina)	Actividad específica (N-acetilglucosamina en $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de proteína/min)
<i>T. gamsii</i>	0.151 ab	0.102 b
<i>T. virens</i>	0.107 b	0.179 ab
<i>T. longibrachiatum</i>	0.228 a	0.255 a
<i>T. asperellum</i>	0.164 ab	0.165 b

^aTratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).

Se sabe que las β -glucanasas fúngicas son reconocidas por realizar un gran número de funciones entre las que se encuentran la movilización de los glucanos de la pared celular y el almacenamiento de carbohidratos en situaciones de escasez de nutrientes (Kuhn *et al.*, 1990), la degradación de calosa de plantas por los fitopatógenos, la nutrición de saprófitos, y la participación en el mecanismo de ataque y nutrición del micoparásito (Howell, 2003). Las β -1,3-glucanasas son enzimas clave responsables de la lisis y la degradación de la pared celular de los hongos esclerotio (El-Katatny, 2008). La actividad enzimática de las glucanasas obtenida para las cuatro especies de *Trichoderma* fluctuó entre 0.22 a 0.47 μmol de glucosa, mientras que la actividad específica fue de 1.24 a 2.78 de $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de glucosa/mg de proteína (Cuadro 7). *T. longibrachiatum* fue la especie que mostró mayor cantidad de actividad enzimática (0.47), sin embargo, *T. gamsii* y *T. virens* fueron los que mostraron mayor cantidad de actividad específica, lo cual se observó que difiere entre especies en la cantidad de glucanasas que producen. La actividad de glucanasas por diferentes especies de *Trichoderma* ha sido reportada por Michel-

Aceves *et al.* (2005), ya que encontraron cantidades más altas en *T. koningii* (1747.2), *T. longibrachiatum* (1400), *T. virens* (1045) y *T. harziamun* (1232). González *et al.*, (2011) reportaron que la actividad enzimática específica para las β -1,3-glucanasas de *Trichoderma* spp., se comportaron de forma desigual en dependencia de la fuente de carbono empleado. Sin embargo los resultados obtenidos por en este trabajo difieren a los reportados por Bruce *et al.* (1995) quienes mencionaron que la actividad total varió de 50 a 241 μmol de glucosa, es decir, obtuvieron mayores cantidades comparadas a las obtenidas en este trabajo, sin embargo, en actividad específica son similares de 0.90 a 4.44 $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de glucosa/proteína, no obstante estos autores mencionan que las cantidades pueden diferir dependiendo el medio de cultivo y la especie de *Trichoderma*.

Cuadro 7. Actividad de glucanasas por cepas de *Trichoderma* spp.

Tratamientos	Actividad enzimática (μmol de glucosa)	Actividad específica (μmoles de glucosa/mg de proteína/min)
<i>T. gamsii</i>	0.35 ab ^z	2.78 a
<i>T. virens</i>	0.28 ab	2.44 a
<i>T. longibrachiatum</i>	0.47 a	1.24 b
<i>T. asperellum</i>	0.22 b	1.26 b

^zTratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).

3.5.1. Evaluación antibiótico de glucanasas y quitinasas producidos por *Trichoderma* spp., contra *P. parasitica* y *F. oxysporum*.

Uno de los mecanismos de acción que tiene *Trichoderma* es el micoparasitismo, en la cual para que se lleve a cabo el antagonista produce diversos enzimas, entre las que destacan son las quitinasas y glucanasas (Küçük y Kivanç, 2008). De acuerdo con lo anterior, De Marco *et al.* (2004) y Vázquez-Garcidueñas *et al.* (1998) indicaron que las quitinasas y 1,3- β -glucanasas de *Trichoderma* spp. tienen la capacidad de provocar lisis de las paredes celulares de los hongos fitopatógenos ejerciendo efecto antibiótico sobre estos y este efecto fue observado en las especies de *Trichoderma* aquí evaluadas. Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento micelial de *P. parasitica* infestados con *T. gamsii*, *T. asperellum* y *T. longibrachiatum*; sin embargo, el testigo (control positivo) mostró menor crecimiento micelial en todos los tratamientos evaluados (Cuadro 8 y 9). *T. longibrachiatum* fue la especie que mostró mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de *P. parasítica*, la inhibición se manifestó en un 15 % (6.7 cm) cuando se usaron quitinasas, y con glucanasas la inhibición alcanzada fue del 6.5% (7.2 cm) comparadas con el efecto inhibitorio producido por las otras especies de *Trichoderma* evaluadas (Figura 6); los resultados obtenidos en este trabajo se relacionan con los reportados por Sánchez *et al.* (2007), quienes observaron la producción de glucanasas por cepas nativas de *T. longibrachiatum* Rifai probadas contra *Thielaviopsis paradoxa*, dicha producción contribuyó a la degradación de las hifas del hongo. Además, se observó crecimiento micelial abundante de *P. parasitica* expuestas a las enzimas producidas por *T. asperellum*, *T. virens* y *T. gamsii*, lo cual se le atribuye a la presencia específica de algunos inhibidores de enzimas degradadores de pared celular, en el mismo sentido estudios realizados por Ait-Lahsen (2001) mencionaron que la glucanasa AGN13.1 es capaz de unirse a las paredes celulares de diversos

hongos fitopatógenos tales como *A. niger*, *B. cinerea*, *C. acutatum*, *F. oxysporum*, *P. aurantiogriseum* y *R. solani* inhibiendo su crecimiento, pero no a las de *P. syringae*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*, lo cual quiere decir que debe existir cierta especificidad o reconocimiento entre la enzima y la pared celular del patógenos. Con base a lo anterior, las enzimas producidas por *Trichoderma* aquí evaluadas no mostraron un efecto contundente en la inhibición de *P. parasitica* y *F. oxysporum*.

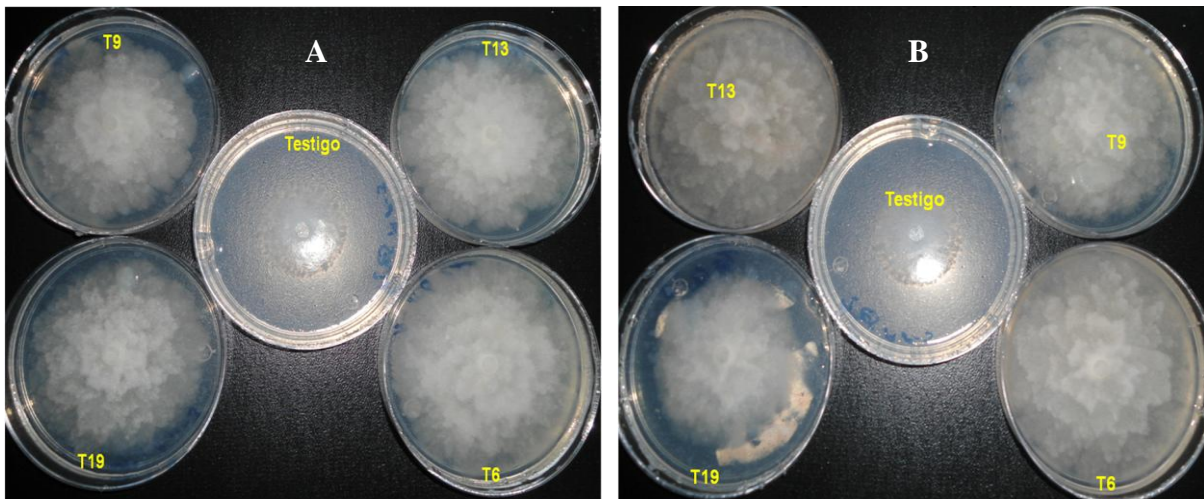


Figura 6. Efectividad de quitinasas (A) y glucanasas (B) de *T. asperellum* (T9), *T. virens* (T6), *T. gamsii* (T13), *T. longibrachiatum* (T19) y Testigo (sin aplicar) sobre *P. parasitica*.

P. parasitica tiene la capacidad de producir glucanasa y quizás fue otro de los factores por la que no presentó efecto inhibitorio. Bartinicki-García y Wang (1983) mencionaron que las paredes celulares de los Oomycetes están compuestas principalmente por β -1, 3 y β -1, 6 glucanos y de celulosa (β -1,4-glucano), mientras que la quitina, es un componente esencial de las paredes celulares de los hongos, pero no para los Oomycetos. Fayad *et al.* (2001) reportaron que para la degradación total de los componentes de la pared celular se requiere de la participación de enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar la β -1,6 en varias configuraciones moleculares (polímeros lineales, polímeros ramificados, moléculas oligoméricas), estas enzimas han sido

aislados en diferentes especies de bacterias y hongos. Estudios realizados por De Marco y Felix (2007) indicaron que la β -1,3-glucanasa producida por *T. harzianum* no mostró efecto inhibitorio sobre la pared celular de *Crinimepellis permiciosa*.

Cuadro 8. Efecto antibiotico de las quitinasas de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de *P. parasitica* (*Pp*) y *F. oxysporum* (*Fo*).

Tratamientos	Crecimiento de <i>Pp</i> (cm)	Crecimiento de <i>Fo</i> (cm)	No. de conidios de <i>Fo</i>	No. de UFC de <i>Fo</i>
<i>T. virens</i>	7.9 a ^z	7.8 a	11.3 a	153 a
<i>T. gamsii</i>	7.7 a	8.0 a	5.6 a	56 c
<i>T. asperellum</i>	7.5 a	7.8 a	6.6 a	138 ab
<i>T. longibrachiatum</i>	6.7 b	4.4 c	6.3 a	89 bc
Testigo (sin aplicar)	3.4 c	5.9 b	2.0 a	41 c

^zTratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$). UFC (unidades formadores de colonia).

El efecto antibiótico de glucanasas y quitinasas producidos por *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.0001$). *T. longibrachiatum* fue la que tuvo mayor efecto inhibitorio en el crecimiento micelial del patógeno. Las quitinasas y glucanasas producidas por *T. longibrachiatum* mostraron el 40 % (4.4) y 45 % (4.8 cm) respectivamente en la inhibición micelial de *F. oxysporum* (Cuadro 9). Los resultados reportados por Michel-Aceves *et al.* (2005) indicaron que las glucanasas y quitinasas producidas por las especies de *T. koningii* y *T. harzianum* inhibieron el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, además en este trabajo se encontró que el efecto de las

enzimas difieren entre especies. Así mismo, también se observó crecimiento abundante de *F. oxysporum* con las enzimas producidas por *T. asperellum*, *T. virens* y *T. gamsii* (Figura 7); es decir, las enzimas no mostraron efecto inhibitorio en el crecimiento micelial del patógeno, así mismo se observó que en el testigo (agua destilada) se mostro el pigmento (violeta) típico de *F. oxysporum*, caso contrario sucedió donde se inocularon las enzimas tanto glucanasas como quitinasas. Una posible explicación es la capa de proteínas (7 o 8 % peso seco) que cubre las paredes celulares de la quitina y el glucano, pudiendo así proteger de la acción litica de las quitinasas y glucanasas (Schoffelmeer *et al.*, 1999).

Cuadro 9. Efecto antibiótico de las glucanasas de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de *P. parasitica* (*Pp*) y *F. oxysporum* (*Fo*).

Tratamientos	Crecimiento de <i>Pp</i> (cm)	Crecimiento de <i>Fo</i> (cm)	No. de conidios de <i>Fo</i>	UFC de <i>Fo</i>
<i>T. virens</i>	7.7 a ^z	8.0 a	8.3 a	87 bc
<i>T. gamsii</i>	7.3 b	8.0 a	8.3 a	124 ab
<i>T. asperellum</i>	7.2 b	8.0 a	9.6 a	149 a
<i>T. longibrachiatum</i>	7.2 b	4.8 c	3.3 a	97 abc
Testigo (sin aplicar)	3.4 c	5.8 b	2.0 a	41 c

^zTratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales entre sí (Tukey, $P \leq 0.05$).

Además, Nelson *et al.* (1993) mencionaron que *F. oxysporum* tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios tales como micotoxinas, tricotecenos, micotoxinas, pigmentos, antibióticos y fitotoxinas, que pudieron influir para que *F. oxysporum* no se inhibiera. En la evaluación del

número de conidios y UFC se encontraron diferencia significativas ($P \leq 0.0001$) entre los tratamientos evaluados y se demostró que existe relación en el efecto del crecimiento micelial; es decir, a mayor crecimiento micelial mayor número de conidios y por lo tanto mayor número de UFC; era importante evaluar las variables anteriores, debido a que es la forma de reproducción de *F. oxysporum*, además se comprobó que no hay disminución de la viabilidad de los conidios, los cual difiere con los reportando por Michel-Aceves *et al.*, (2005).

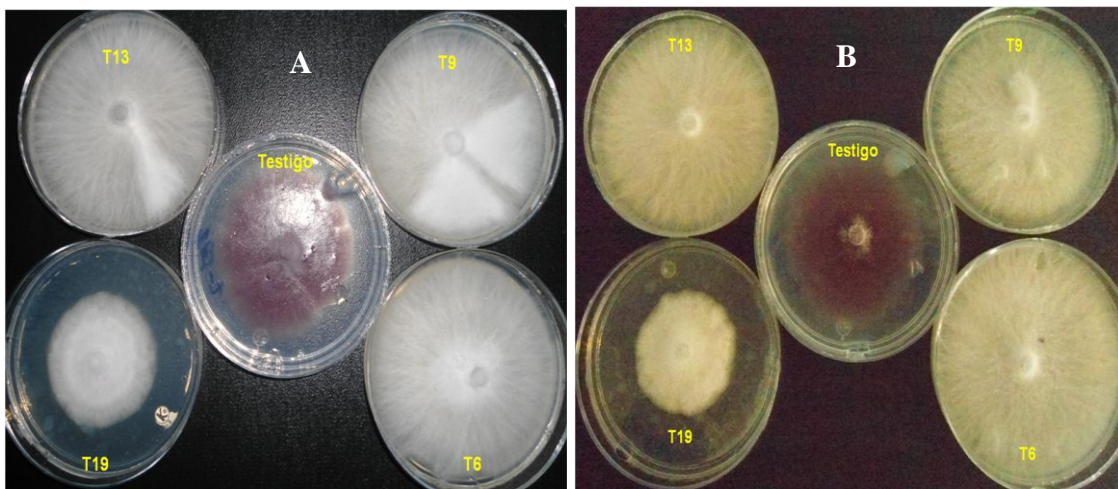


Figura 7. Efectividad de quitinasas (A) y glucanasas (B) de *T. asperellum* (T9), *T. virens* (T6), *T. gamsii* (T13), *T. longibrachiatum* (T19) y Testigo (sin aplicar) sobre *F.oxysporum*.

3.6. CONCLUSIONES

T. longibrachiatum fue la que mostró mayor actividad enzimática y específica en quitinasas y glucanasas. Las glucanasas producidas por *T. longibrachiatum* mostraron el 40 % de inhibición micelial de *F. oxysporum* (4.8 cm). Las quitinasas de *T. longibrachiatum* mostraron 15 % de efecto inhibitorio en *P. parasitica* (6.7 cm) y en 45 % para *F. oxysporum* (4.4), respectivamente.

3.7. LITERATURA CITADA

- Anitha, A. and M. Rabeeth. 2010. Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungus by lytic enzyme of *Streptomyces griseus*. African Journal of plant Science 4:061-066.
- Bartinicki-Garcia S. and M. C. Wang. 1983. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In: Bartinicki-Garcia S, Tsao PH, editors. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, p. 121-37.
- Sánchez, V., O. Rebolledo, R. M. Picaso, E. Cárdenas, J. Córdova, O González and G. J. Samuels. 2007. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. Mycopathologia 163:49–58.
- Ait-Lahsen, H., A. Soler, M. J. Rey, J. de la Cruz, E. Monte, and A. Llobell. 2001. An antifungal Exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 67:5833-5839.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycology Institute. Kew, Surrey, United Kingdom. 237 p.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem. 72: 248-254.
- Bruce, A., U. Srinivasan, H. J. Staines and T. L. Highley. 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp. and their role in biocontrol of wood decay fungi. Intern. Biodet. & Biodeg. 23: 337-353.
- Budi, S.W., D. van Tuinen, C Arnould, E. Dumas-Gaudot, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi. 2000. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. Strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. Applied Soil Ecology 15:191-199.
- De Marco, J. L. and C. R. Felix. 2007. Purification and Characterization of a β -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* Showing Biocontrol Potential. Brazilian Archives Of Biology And Technology and International Journal 50: 21-29.
- De Marco, J. L., M. C. Valadares-Inglis and C. R. Felix. 2004. Purification and characterization of Nacetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicioso*. Appl Microbiol Biotechnol. 64:70-75.
- De Marco, J. L., M. C. Valadares-Inglis and C. R. Felix. 2003. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. Brazilian Journal of Microbiology 34:33-38.
- El-Katatny M. H. A. 2008. The activity of β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* in native form and after immobilization on calcium alginate. Arch Phytopathol.; 41:175-186

- Erwin, D. C. and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- Esparza-Luna. L. L. 2009. Efectividad *In Vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en aislados de *Phytophthora parasitica* D. obtenidos de plantas de jamaica. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, 7-21 pp.
- Fayad, K. P., A. M. Simao-Beauvoir, C. Gauthier, A., Leclerc, H. Mamady, C. Beaulieu, and R. Brzezinski. Purification and properties of a β -1,6-glucanase from *Streptomyces* sp. EF-14, an actinomycete antagonistic to *Phytophthora* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:117-123.
- Ferrin, D. M. and M. L. Wadsworth. 1992. Effect of metalaxyl on sporulation and growth of metalaxyl-resistant and metalaxyl-sensitive isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant disease* 76:492-495.
- González, I., D. Infante, B. Martínez, Y. Arias, N. González, I. Miranda, y B. Peteira. 2012. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. *Biotecnología Aplicada* 29: 7-11.
- González, I., D. Infante, B. Peteira, B. Martínez, Y. Arias, N. González y I. Miranda. 2011. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasa. *Rev. Protección Veg.* 26: 23-29.
- González, I., D. Infante, B. Peteira, B. Martínez, Y. Arias, N. González y I. Miranda. 2010. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. I. Expresión de actividad quitinasa. *Rev. Protección Veg.* 25: 58-63.
- Hadar, Y., I. Chet and Y. Henis. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 69: 64-68.
- Harman, G. E., C. K. Hayes, M. Lorito, R. M. Broadway, A. Dipietro, C. Peterbauer and A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83: 313-318.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.*;87(1):4-10.
- Kucuk, C. and M. Kivanc. 2004. *In vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. *Turk. J. Biol.* 28: 111-115.
- Küçük, Ç. and M. Kivanç. 2008. Effect of Carbon Source on Production of Lytic Enzymes by *Trichoderma*. *Journal of Applied Biological Sciences* 2: 23-26.
- Kuhn, P. J., A. P. J. Trinci, M. J. Jung, M. W. Goosey, L. G. Copping. 1990. *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Berlin/Heidelberg: Springer- Verlag.

- Leslie, J. F. and B. A. Summerell. 2006. *The Laboratory Fusarium. Manual.* Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Lima, L., H. C., J. L. De Marco, C. J. Ulhoa y C. R. Felix. 1999. Synthesis of *Trichoderma* chitinase which affects the *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. *Folia Microbiol.* 44: 45-49.
- Lucas, A. J., L. A. Bower and M. D. Coffey. 2008. Fungicide resistance in soil-borne *Phytophthora* species. *EPPO Bulletin*, 1365-2338.
- Madi, L., T. Katan, J. Katan and Y. Henis. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology* 87:1054-1060.
- Martin, N. F., J. Blair, E. Coffey and D. A. Michael. 2014. Combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* 66:19-32.
- Michel-Aceves, A. C., M. A. Otero-Sánchez, O. Rebolledo-Domínguez, R. Lezama-Gutiérrez y M. E. Ochoa-Moreno. 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.
- Mukherjee, B., A. Horwitz, A. Herrera-Estrella, M. Schmoll, C. Prasun and K. M. Kenerley. 2013. *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:105-29.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 375-380.
- Nelson, P. E., A. E. Desjardins and R. D. Plattner. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:233-52.
- Perez, C. J. 2004. Organic farming: an alternative to sustainable development in rural Mexico. *The Cotidiano* 20: 95-100.
- Schoffelmeer, E. A. M., F. M. Klis and B. J. C. Cornelissen. 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Gen. Biol.* 27: 275-282.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195:19-23.
- Vazquez-Garciduenaz, S., C.A. Leal-Morales and M.Herrera- Estrella. 1998. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ. Microbiol.* 64: 1442-1446.
- Worasatit, N., K. Sivasithamparam, E. L. Ghisalbert and C. Rowland. 1994. Variation in pyrone production, lytic enzymes and control of *Rhizoctonia* root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycol. Res.* 98:1357-1363.
- Zeilinger, S. and M. Omann. 2007. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene. Regul. Syst. Bio.* 1:227-234.

CAPÍTULO IV

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

En México no se han realizado estudios de la efectividad de *Trichoderma* spp., para manejo de la “pata prieta” en cultivo de la jamaica. Esta enfermedad es causada por *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*, además estos son capaces de infectar una amplia gama de especies de plantas cultivadas en todo el mundo (Leslie y Summerell, 2006; Ploetz, 2006). Por lo anterior, es de suma importancia esta investigación debido que el uso de *Trichoderma* es una alternativa para el manejo de esta enfermedad. En el mismo sentido, Howell (2002) y Harman *et al.* (2004) señalaron que varias de las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de colonizar el área del sistema de raíces de plantas donde se aplica, con la finalidad de conferir protección y estos pueden actuar contra los fitopatógenos a través de la producción o liberación de varios compuestos que pueden inducir respuesta de resistencia sistémica adquirida o localizada en las plantas. En esta investigación se observó que no todas las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de disminuir la incidencia de la pata prieta tanto en campo como en invernadero, entre las que destacan son *T. longibrachiatum* y *T. gamsii*, esto debido a que las bondades como agente de control dependen más de las cepas de *Trichoderma*, estas especies mostraron rápido crecimiento y esporulación, además de soportar condiciones ambientales extremas, estas pueden presentar diferencias en sus modos de acción, aún perteneciendo a una misma especie. También se observó que la incidencia aumento a atraves del tiempo, esto se le atribuye por el aumento de lluvia en los meses de septiembre y octubre, además son condiciones adecuadas para que se presente *P. parasitica*. Por tal motivo, esto refuerza la necesidad de efectuar una correcta selección de los aislamientos respecto a sus ambientes, para obtener resultados consistentes en condiciones de campo o invernadero (Martinez *et al.*, 2013). La capacidad como antagonista

de *Trichoderma* es altamente variable, esto debido a que cada especie puede tener cierto mecanismo de acción, además por su capacidad de esporulación y crecimiento. En el mismo sentido Mihuta-Grimm y Rowe (1986) demostraron que de 255 aislamientos obtenidos de diferentes lugares, solo el 15% fue efectivo en el control de *Rhizoctonia* y que las cepas nativas de un lugar son más efectivas que las introducidas. Esta capacidad depende de la especificidad de la cepa y de sus modos de acción; es decir pueden existir aislamientos que sean más eficientes para el control de un patógeno que de otro; por tal motivo, la especificidad debe ser evaluada (Martínez *et al.*, 2008). En este estudio se encontró que *T. longibrachiatum*, *T. gamsii* y *T. virens* incremento en el peso fresco y seco de la planta de jamaica, lo cual quiere decir que *Trichoderma* mostro incremento en la parte aérea, sin embargo caso contrario sucedió con *T. asperellum* y esto concuerda con los reportado por varios autores, quienes mencionan que *Trichoderma* aumentó la parte foliar en diferentes cultivos y patógenos (Benítez *et al.*, 2004; Hoyos-Cabral *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2008; Azarmi *et al.*, 2011; Badar y Qureshi, 2012).

Uno de los mecanismos de acción que tiene *Trichoderma* spp., es el micoparasitismo en la producción de enzimas (Küçük y Kivanç, 2008). *Trichoderma* spp., produce diversos enzimas tales como glucanasas, quitinasas, celulasas, proteasas y amilasas (De Marco *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 2012). De Marco *et al.* (2004) y Vázquez-Garcidueñas *et al.* (1998) sugieren que las quitinasas y 1,3- β -glucanasas son de las enzimas clave en la lisis de las paredes celulares de los hongos fitopatógenos durante la acción antagónica de *Trichoderma* spp. Las enzimas producidas por el antagonista han mostrado tener efecto inhibitorio sobre diversos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* (Lima *et al.*, 1999); *F. oxysporum* y *P. parasitica* (Budi, *et al.*, 2000). En la evaluación de quitinasas y glucanasas producidas por las cuatro especies de *Trichoderma* contra *P. parasitica* y *F. oxysporum*, se encontró que *T. longibrachiatum* mostró

efecto inhibitorio en el crecimiento micelial en los dos fitopatógenos, sin embargo, es de suma importancia mencionar que no todas las especies de *Trichoderma* mostraron dicho efecto en los patógenos, es decir que difieren en su especificidad contra estos, lo cual concuerda a los obtenidos por Michel-Aceves *et al.* (2005) quienes mencionaron que las quitinasas y glucanasas producidas por *T. harzianum* tienen efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *F. subglutinans* y *F. oxysporum* y difiere el efecto entre especies del agente antagonico.

Con base a lo anterior, para incrementar el potencial antagónico de *Trichoderma* es necesario realizar combinaciones con compostas, lombricompostas, extractos de plantas, además, combinarlas con bacterias como *Bacillus* y *Streptomyces*. En este mismo sentido, realizaría combinaciones entre especies de *Trichoderma*, esto debido a que no todos tienen el mismo mecanismo de acción. Sin duda que esto ayudaría a potenciar a las especies de *Trichoderma* contra los fitopatógenos.

Los resultados de los experimentos del presente trabajo son una aportación hacia la posible utilidad de *Trichoderma* spp., en la implementación de programas de control biológico como una estrategia viable dentro del manejo integrado del cultivo de jamaica y de manera regionalizada, que como lo demostraron los trabajos de campo.

4.2. LITERATURA CITADA

- Azarmi, R., B. Hajieghrari and A. Giglou. 2011. Effect of *Trichoderma* isolates on tomato seedling growth response and nutrient uptake. *African Journal of Biotechnology* 10:5850-5855.
- Badar, R. and S. A. Qureshi. 2012. Use of *Trichoderma hamatum* alone and in combination with *Rhizobial* isolates as biofertilizer for improving the growth and strength of sunflower. *Journal of Basic and Applied Scientific Research* 2:6307-6314.
- Benítez, T. A., M. L. Rincón and A. Codón. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.

- Budi, S.W., D. van Tuinen, C. Arnould, E. Dumas-Gaudot, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi. 2000. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. Strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Applied Soil Ecology* 15:191-199.
- De Marco, J. L., M. C. Valadares-Inglis and C. R. Felix. 2004. Purification and characterization of Nacetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis pernicioso*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64: 70-75.
- De Marco, J. L., M. C. Valadares-Inglis and C. R. Felix. 2003. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:33-38.
- González, I., D. Infante, B. Martínez, Y. Arias, N. González, I. Miranda, y B. Peteira. 2012. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. *Biotecnología Aplicada* 29: 7-11.
- Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I Chet, M. Lorito,. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev.* 2:43-56. 81
- Howell, C. R. 2002. Cotton seedling pre-emergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92:177-180.
- Hoyos-Carbajal, L., M. S. Jaramillo, V. y S. Orduz P. 2008. Evaluación de *Trichoderma asperellum* como biorregulador de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 61: 4496-4502.
- Küçük, Ç. and M. Kivanç. 2008. Effect of Carbon Source on Production of Lytic Enzymes by *Trichoderma*. *Journal of Applied Biological Sciences* 2: 23-26.
- Leslie, J. F. and B. A. Summerell. 2006. *The Laboratory Fusarium. Manual.* Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Lima, L., H. C., J. L De Marco, C. J. Ulhoa y C. R. Felix. 1999. Synthesis of *Trichoderma* chitinase which affects the *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* cell walls. *Folia Microbiol.* 44: 45-49.
- Martínez, B., Y. Reyes, D. Infante, E. González, H. Baños y A. Cruz. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Rev Protección Veg.*23:118-125.
- Martínez, B., D. Infante y Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal* 1:1-11.
- Michel-Aceves, A. C., M. A. Otero-Sánchez, O. Rebolledo-Domínguez, R Lezama-Gutiérrez y M. E. Ochoa-Moreno. 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.

- Mihuta-Grimm, L. and C. Rowe. 1986. *Trichoderma* spp. As biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems. *Phytopathology* 76:306-312.
- Ploetz, R. C. 2006. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology* 96:648-652.
- Torres E., J. Iannacone y H. Gómez. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia* 67: 169-178.
- Vazquez-Garciduenaz, S., C.A. Leal-Morales and M. Herrera- Estrella. 1998. Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ. Microbiol.* 64:1442-1446.

5.1. CONCLUSIONES GENERALES

Las plantas tratadas con *T. longibrachiatum* mostraron menor (15%) incidencia de la pata prieta y en el lote 1 el rendimiento (peso seco del caliz) fue mayor, bajo condiciones de campo. El análisis de suelo mostró diferencias en la cantidad de MO y en la cantidad de macro y micronutrientes, por lo tanto puede ser un factor que influyó en el variable rendimiento entre los lotes.

La evaluación bajo condiciones de invernadero, *T. longibrachiatum* y *T. gamsii* redujeron la incidencia de *P. parasitica* y aumento peso fresco y seco de la planta. Las plantas infectadas con *F. oxysporum* y tratadas con los antagonistas *T. virens* y *T. gamsii* aumentaron la altura, peso fresco y seco de la planta de jamaica.

T. longibrachiatum fue la que mostró mayor actividad enzimática y específica en quitinasas y glucanasas. Además fue la que mostró efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *P. parasitica* y *F. oxysporum*.

T. longibrachiatum fue la que disminuyó la incidencia de la “pata prieta” en las plantas de jamaica, en campo como en invernadero. Así mismo, se obtuvo mayor cantidad de enzimas y demostró efecto inhibitorio de las quitinasas y glucanasas con los dos fitopatógenos. Por lo anterior, se sugiere su uso para el manejo de la “pata prieta”.

Esta tesis se realizó con recursos del poroyecto “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”, con clave 163972 financiado por el fondo sectorial SAGARPA-CONACYT.