

ANTAGONISMO ENZIMÁTICO DE *Trichoderma* spp. SOBRE *Fusarium oxysporum* Y *Phytophthora parasitica* EN *Hibiscus sabdariffa* L.

Javier Hernández-Morales¹, Teolincacihuatl Romero-Rosales², Alejandro C. Michel-Aceves³, Mateo Vargas-Hernández⁴, Abraham Monteon-Ojeda² y José L. Valenzuela-Lagarda²

RESUMEN

México es el séptimo productor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), y el estado de Guerrero concentra más del 70 % de la producción nacional. El cultivo presenta limitantes fitosanitarias importantes, destacando la "pata prieta" asociada a un complejo de patógenos (*Fusarium oxysporum* y *Phytophthora parasitica*), con pérdidas de hasta 100 % en áreas sin manejo fitosanitario. Debido a la naturaleza del consumo del producto final, es necesaria la implementación de estrategias ecológicas de manejo de la enfermedad. El objetivo del estudio fue cuantificar la actividad de quitinasas y glucanasas de aislados *Trichoderma* spp., y evaluar su efecto inhibitorio *in vitro* sobre *F. oxysporum* y *P. parasitica*. Se evaluaron las cepas Ta10, Ta11, Ta6 y Ta9 de *T. asperellum* y Ti14 de *T. inhamatum* provenientes de suelos cultivados con jamaica y alta incidencia de los patógenos. Los niveles de quitinasas y glucanasas en todos los aislados de *Trichoderma* spp. fueron significativos ($P \leq 0,05$); la cepa Ta9 mostró la mayor actividad específica de quitinasas, y la cepa Ti14 la mayor de glucanasas. Todos los filtrados provenientes de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp. generaron una inhibición sustancial del crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *P. parasitica*. De manera consistente, la cepa Ta9 alcanzó porcentajes de inhibición mayores al 90 % en ambos ensayos. Se detectó correlación significativa entre la actividad enzimática y la inhibición del crecimiento de los aislados de *Trichoderma* spp. sobre los agentes patógenos.

Palabras clave adicionales: Antibiosis, actividad enzimática, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma inhamatum*

ABSTRACT

Enzymatic antagonism of *Trichoderma* spp., on *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum* in *Hibiscus sabdariffa* L.

Mexico is the seventh largest producer of jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), and Guerrero State agglomerates more than 70 % of the national production. The crop presents important phytosanitary limitations, highlights the "black leg" associated with a complex of pathogens (*Fusarium oxysporum* and *Phytophthora parasitica*). Losses up to 100 % are reported in areas without phytosanitary management. Due to the nature of the consumption of the final product, it is necessary to implement ecological strategies to manage the disease. The objective of the study was to quantify the chitinases and glucanases activity of *Trichoderma* spp. isolates, and to evaluate their inhibitory effect *in vitro* on *F. oxysporum* and *P. parasitica*. Strains Ta10, Ta11, Ta6 and Ta9 of *T. asperellum* and Ti14 of *T. inhamatum* from soils cultivated with jamaica and high incidence of the pathogens were evaluated. The levels of chitinases and glucanases produced in all *Trichoderma* spp. were significant ($P \leq 0,05$), and it was found that Ta9 had the highest specific chitinase activity, and Ti14 the highest for glucanase. All the filtrates from the different isolates of *Trichoderma* spp. generated a substantial inhibition of mycelial growth of *F. oxysporum* and *P. parasitica*. Consistently, the strain Ta9 produced inhibition percentages greater than 90 % in both tests. A significant correlation was detected between the enzymatic activity and the inhibition of the growth of the *Trichoderma* spp. isolates on pathogens.

Additional keywords: Antibiosis, enzymatic activity, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma inhamatum*

INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es

originaria de India y zonas aledañas al continente asiático (Morton, 1987). México es el séptimo productor del cultivo con un 6 % de la producción

Recibido: Enero 15, 2021

Aceptado: Julio 20, 2021

¹ Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

e-mail: hjavier@colpos.mx

² Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero Javier Méndez Aponte, Chilpancingo, Guerrero, México. e-mail: teolinc@hotmail.com (autor de correspondencia); abraham.monteon@gmail.com, joseluislagarda@uagro.mx

³ Departamento de Fitotecnia, Centro de Estudios Profesionales-Colegio Superior Agropecuario del estado de Guerrero. Cocola, Guerrero, México. e-mail: amichelaceves@yahoo.com.mx

⁴ Posgrado de Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. e-mail: vargas_mateo@hotmail.com

mundial (98 mil Mg·año⁻¹) (FAOSTAT, 2019), concentrando la mayor producción en los estados de Guerrero, Puebla, Nayarit, Michoacán y Oaxaca (SIAP, 2020). En Guerrero, se cultivan alrededor de 14 mil ha de jamaica, la entidad representa al principal productor a nivel nacional con más del 75 % de la producción, cuyo destino es mayormente el mercado nacional. En este mismo estado, la región de “Tecoanapa-Ayutla” representa la zona productora más importante de México; allí, el cultivo representa una actividad económica importante por ser una fuente primaria de empleo.

El cultivo de jamaica presenta problemas fitosanitarios importantes que limitan la producción y generan pérdidas económicas sustanciales; entre éstos, destaca la “pata prieta”, enfermedad ocasionada por un complejo asociado a *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Corynespora cassicola* y *Coniella diplodiella*. Dicho padecimiento representa la principal limitante fitosanitaria del cultivo en las principales regiones productoras del mundo (Larroque et al., 2013; Meléndez et al., 2016; Ortega et al., 2015). Los síntomas típicos de la enfermedad son la necrosis basal, marchitez generalizada, clorosis en hojas, manchado, pudrición de cáliz y muerte de la planta (Mohiddin et al., 2010; Veena y Reddy, 2014). La enfermedad puede ocasionar pérdidas del 50 al 100 % si no se realizan actividades de manejo adecuadas (Alarcón y Legaria, 2013; Bobadilla et al., 2016; Michel et al., 2009). El principal daño se presenta en floración, ocasionando pérdidas directas en la producción de cálices de calidad (Ortega, 2015).

Convencionalmente, el método de control para el manejo de la enfermedad en la región es el tratamiento químico mediante aplicaciones subsecuentes de fungicidas con actividad sistémica; dicho método ha demostrado ser eficiente; sin embargo, se han reportado efectos negativos en el impacto ambiental, desarrollo de resistencia en fitopatógenos y debido a la naturaleza del consumo del producto (consumo en fresco o infusión de cálices), existen riesgos a la salud humana (Kroon et al., 2012; Osorio et al., 2016). Sobre la base anterior, es necesario generar alternativas eficaces e inocuas de manejo. El control biológico de la enfermedad mediante el uso de antagonistas naturales es una alternativa viable, inocua y ecológica mediante el incremento

artificial y masivo de poblaciones del agente de control, favoreciendo la invasión y ocupación de nichos ecológicos, limitando el desarrollo de las poblaciones de fitopatógenos (Harman, 2011). El género *Trichoderma* spp. está ampliamente distribuido en múltiples regiones del mundo, cuenta con más de 200 especies, muchas de ellas utilizadas como agentes de control biológico (Michel et al., 2009); Se ha reportado el biocontrol, con el uso de especies de *Trichoderma* spp., en una amplia variedad de agentes fitopatógenos foliares y del suelo entre los que destacan *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *F. oxysporum*, *P. parasitica*, *Pythium ultimum*, *Verticillium* spp. y *Thelaviopsis* spp. (Bhale et al., 2013; Hoyos et al., 2008; Michel et al., 2009). *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma inhamatum* son especies que destacan por su amplio espectro de control (González et al., 2012; Guigón et al., 2014; Jeyaseelan et al., 2012) no obstante, sus efectos sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum* no se conocen con precisión.

Durante el proceso de micoparasitismo, *Trichoderma* spp. sintetiza enzimas como proteasas, quitinasas y glucanasas que hidrolizan las paredes celulares de otros hongos y oomicetos inhibiendo la germinación de sus esporas, elongación del tubo germinativo y, por lo tanto, la infección a la planta (González et al., 2012; Marcello et al., 2010; Romero et al., 2016). Las glucanasas y otras enzimas obtenidas de *Trichoderma* han sido efectivas en disminuir la severidad de enfermedades fungosas (Pittner et al., 2019). Tomando en cuenta lo antes señalado, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de quitinasas y glucanasas obtenidas de múltiples aislados de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *F. oxysporum* y *P. parasitica* obtenidos de plantas de jamaica con síntomas de “pata negra” asociada a los patógenos antes mencionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas en estudio. Se utilizaron cuatro cepas de *Trichoderma asperellum* (Ta6, Ta9, Ta10 y Ta11) y una cepa de *Trichoderma inhamatum* (Ti14). Estas fueron aisladas de suelo cultivado con jamaica en los municipios de Tecoanapa y Ayutla, principales productores del estado de Guerrero

(sur de México) localizados entre las coordenadas 16°58' N - 99°16' W y 16°57' N - 99°05' W, ambos con un clima subhúmedo cálido con temperatura y precipitación promedio anual de 28,5 °C y 1510 mm y 29,3 °C y 1,670 mm, respectivamente (SMN, 2018); dichas cepas fueron caracterizadas e identificadas molecularmente por Linda Esparza (CP, México. Datos no publicados). Los agentes fitopatógenos, *F. oxysporum* y *P. parasitica*, fueron obtenidos a partir de plantas con síntomas de "pata negra" provenientes de zonas productoras de los municipios de Tecoaapa y Ayutla, Guerrero y caracterizados utilizando particularidades morfológicas y tipologías culturales con la ayuda de las claves de Barnett y Hunter (2006), Booth (1971) y Gallegly y Hong (2008).

Inducción enzimática en medio líquido. Las cepas de *T. asperellum* y *T. inhamatum*, se subcultivaron en cajas Petri de 9 cm con medio de cultivo PDA (23 g·L⁻¹) a pH 5,6 ± 0,2 y se incubaron a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) durante 5 días en condiciones de 8:16 horas (luz: oscuridad), pasado este tiempo, se tomó micelio para el desarrollo del ensayo como lo sugiere Adams (2004). Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero (CSAEGRO). Para la producción de las quitinasas y glucanasas, se utilizó un medio de cultivo líquido de acuerdo con la metodología propuesta por Ramada et al. (2010). En matraces Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 50 mL de medio de cultivo [10 g de KNO₃; 5 g de KH₂PO₄; 2,5 g de MgSO₄·7H₂O; 2 mg de FeCl₃; 150 mL de jugo V8; 10 g de polivinilpirrolidona (Sigma, St. Louis, MO) y 100 mL de agua desionizada] adicionado con 1 % (p:v) de quitina en hojuelas para inducir la producción de quitinasas y con 0,1 % (p:v) de laminarina para la inducción de las glucanasas. El pH del medio se ajustó a 6,0 con agua destilada y se esterilizó a 121 °C durante 20 min. Posteriormente, se inoculó con 1 mL de una suspensión de conidios a una concentración de 1x10⁶ conidios·mL⁻¹ de cada cepa, para luego incubar a 25 °C durante 12:12 horas (luz: oscuridad) y 40 % de humedad relativa en un agitador rotatorio a 180 rpm durante 5 días para quitinasas y 8 días para glucanasas (Mohiddin et al., 2010). Transcurrido el periodo de incubación, el medio de cultivo se separó de la biomasa con

papel filtro Whatman N° 1 y centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min. Las partículas residuales que aún permanecieron en el sobrenadante se separaron por filtración a través de fibra de vidrio (Ramot et al., 2000). Inmediatamente a lo anterior, la mitad del filtrado se utilizó para pruebas de inhibición *in vitro* y la otra para determinar la concentración de quitinasas y glucanasas.

Ensayo de quitinasas. La producción de quitinasas se cuantificó con la metodología propuesta por Bara et al. (2003). Se utilizaron tubos con filtrado de las diferentes cepas de *T. asperellum* (Ta6, Ta9, Ta10 y Ta11) y *T. inhamatum* (Ti14) (cuatro tubos por cepa); a cada uno se le agregó 1 mL del filtrado respectivo y 3,8 mg de quitina purificada en polvo (Sigma) en 1 mL de amortiguador McIlvaine de citratos pH 5; después, los tubos se incubaron durante 24 h a 37 °C en baño termostático (baño María). Pasadas 24 h, se tomó una alícuota de 0,5 mL de cada tubo. Posteriormente, a cada tubo se le agregó 0,1 mL de solución 0,8 M de tetraborato de potasio, se sumergieron en agua a 100 °C durante 3 min y se incubaron durante 20 min a 36-38 °C. Pasado ese tiempo, se dejaron enfriar y a cada tubo se agregó 3 mL de p-diametilaminobenzaldehído (DMAB; Sigma). Los tubos se homogenizaron en un vortex durante 1 min y se midió la absorbancia de cada tubo a 500 nm en un espectrofotómetro (Lasso Spec III, Lasso Biotech LTDA) contra un reactivo con corrección de blanco (Adams, 2004). La actividad enzimática total (AT) y específica (AE) de quitinasas se determinó por la cantidad de N-acetilglucosamina liberada, según Harman et al. (1993). El contenido de proteínas de la solución enzimática se determinó con el reactivo de Folin Fenol de acuerdo con Lowry et al. (1951). Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Autónoma de Guerrero, México.

Ensayo de glucanasas. La producción de glucanasas se determinó según González et al. (2010). Se emplearon tubos con filtrado de las diferentes cepas de *T. asperellum* (Ta6, Ta9, Ta10 y Ta11) y *T. inhamatum* (Ti14) (cuatro tubos por cepa); a cada uno se le agregó 1 mL de una solución de 10 mg·mL⁻¹ de laminarina en solución 0,1 M de amortiguador de citratos pH 5. Los tubos se incubaron por 4 h a 40 °C en baño termostático (Bara et al., 2003) después, se les agregó 1 mL del

filtrado. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de reactivo de cobre (CR) descrito por Osorio (2016) e inmediatamente se detuvo la actividad enzimática por inmersión en agua a 100 °C durante 10 min. Posterior a esto, se agregaron 2 mL de reactivo de arsenomolibdato y se aforó a 25 mL con agua destilada. La solución se homogenizó en un vortex durante 1 min para después medir la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21D, Milton Roy), con corrección de blanco para la cuantificación de la actividad enzimática de glucanasas. 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 y 3 g de arseniato disódico en 25 mL de agua (Harman et al., 1993) y se conservó a 37 °C por 2 días antes de utilizarse (Mohiddin et al., 2010). Las lecturas de absorbancia se utilizaron para establecer la actividad de glucanasas por extrapolación de gráfica estándar. La actividad de glucanasas se determinó por la cuantificación de glucosa libre de laminarina, utilizando el reactivo glucosa-oxidasa (Sigma). La actividad de glucanasas se expresa en función de la cantidad de proteína en el extracto enzimático, por lo que el contenido de proteínas se determinó con el reactivo de Folin Fenol de acuerdo con Lowry et al. (1951) y corroborado con el método de Bradford (1976).

Ensayo de antibiosis. Los filtrados obtenidos de los medios de cultivo con las enzimas (quitinasas o glucanasas) provenientes de las cepas de *T. asperellum* y *T. inhamatum* se purificaron con un filtro millipore de 0,22 μm , se utilizaron 10 mL de cada filtrado y se mezcló en proporción 1:1 (v:v) en cajas Petri con medio PDA (5,9 %). Cada caja se inoculó con un disco de 5 mm de diámetro de medio de cultivo PDA (3,9 %) con micelio de colonias de 10 días en crecimiento activo de *F. oxysporum* y *P. parasitica*. Se incubaron a 25 °C durante 12:12 horas (luz:oscuridad) y 40 % de humedad relativa por ocho días. Se utilizaron como testigo cajas Petri con micelio de *F. oxysporum* y *P. parasitica*, respectivamente, más agua destilada estéril en lugar del filtrado de enzimas (Michel et al., 2005). Se registró el diámetro de las colonias cada dos días hasta ocho días después de la inoculación, tiempo en el cual el testigo llenó la superficie de la caja Petri. Los datos del efecto inhibitorio se expresaron en porcentaje de inhibición del

crecimiento micelial.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se estableció un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones y cinco tratamientos (cepas de *Trichoderma*) tanto para glucanasas como para quitinasas. Se determinó la actividad de estas enzimas y el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial obtenido mediante el ensayo de antibiosis. Los porcentajes fueron ajustados mediante una transformación angular (arco seno). Se corroboró la normalidad de los datos obtenidos a través de la prueba de Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Bartlett. Luego, con el fin de detectar diferencias en la actividad de cada enzima de acuerdo a la cepa de procedencia, así como su efectividad contra *F. oxysporum* y *P. parasitica*, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación múltiple de los resultados por la prueba de Tukey. Adicionalmente, se ejecutó un análisis de regresión con el fin de detectar el efecto de la actividad de cada enzima sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento de los patógenos. En todos los análisis se utilizó el paquete estadístico SAS 12.0 (Cary, NC).

RESULTADOS

Ensayo de quitinasas. Los niveles de actividad de quitinasas en todos los tratamientos (cepas de *Trichoderma* spp.) fueron significativos ($P \leq 0,05$), pudo observarse que el aislado Ta9 de *T. asperellum* mostró la mayor actividad específica, por su parte, el aislado Ta10 de la misma especie evidenció los valores más bajos de dicha variable (Cuadro 1). Es de destacar que el comportamiento de la actividad total de esta enzima fue inversa, Ta10 mostró el valor más alto y Ta9 valores significativamente menores. Resultados similares fueron reportados por El-Katatny et al. (2001), con actividad enzimática de quitinasas muy heterogénea, aún entre cepas de la misma especie. Esto ha sido documentado anteriormente en múltiples estudios; por ejemplo, Gonzales et al. (2010) realizaron un análisis de la actividad enzimática específica de quitinasas de 10 cepas de *Trichoderma* spp., sus resultados permitieron aglomerar dichos aislados en cinco grupos muy heterogéneos; del mismo modo, Gonzales et al. (2012) utilizaron nueve cepas del biocontrolador y las conjuntaron según el nivel de actividad de

Hernández et al. Antagonismo de *Trichoderma* sobre *P. parasitica* y *F. oxysporum*

quitinasas en cinco grupos diferentes. Similar a nuestros resultados, Michel et al. (2005), al evaluar la actividad específica de quitinasas en aislados del hongo, encontraron variaciones de 0,33 a 2,29 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ entre aislados. (Cuadro 1). Lo

anterior demuestra la capacidad de *Trichoderma* spp. para sintetizar enzimas como glucanasas y quitinasas asociadas a la inhibición del desarrollo de fitopatógenos y la variabilidad entre aislados de la misma especie (Infante et al., 2009).

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

Cepa	Especie	Actividad total*	Actividad específica**
Ta9	<i>T. asperellum</i>	0,06 a	4,80 a
Ta6	<i>T. asperellum</i>	0,03 b	3,60 b
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	0,03 bc	3,31 bc
Ta11	<i>T. asperellum</i>	0,03 c	2,32 c
Ta10	<i>T. asperellum</i>	0,19 d	0,89 d

* μmol de N-Acetyl-D-glucosamina $\cdot\text{h}^{-1}$; ** μmol de N-Acetyl-D-glucosamina $\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ de proteína.

Medias con la misma letra por columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P\leq 0,05$)

Ensayo de glucanasas. La actividad de glucanasas en todos los tratamientos (cepas de *Trichoderma* spp.) fue significativa ($P\leq 0,05$) en comparación con el testigo y pudieron observarse diferencias entre éstas (Cuadro 2); el aislado Ti14 proveniente de *T. inhamatum* obtuvo los niveles de actividad más altos (70,51 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$), mientras que el aislado Ta11 obtuvo los valores mínimos (22,31 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$), aunque la actividad de glucanasas fue significativamente similar en Ta10 y Ti14, en general aquellas provenientes de *T. asperellum* obtuvieron niveles de actividad significativamente menores. Estos resultados son similares a los de Gonzáles et al. (2012), quienes al evaluar la actividad enzimática de nueve cepas de *Trichoderma* spp. las aglomeraron en cuatro grupos según los niveles de actividad enzimática. Los niveles de actividad de glucanasas encontrados en el presente estudio (Cuadro 2) fueron más elevados que aquellas reportadas por Michel et al. (2005), con concentraciones de actividad de glucanasas máximas de 2,29 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$; sin

embargo, inferiores a las señaladas por Marcello et al. (2010) con 4,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$. Lo anterior sugiere una alta variabilidad en la actividad de estas enzimas aun entre cepas de la misma especie. Similar a nuestros resultados, múltiples investigaciones han demostrado la producción de enzimas intracelulares antibióticas y líticas como glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. que participan en la actividad antagonista del biocontrolador (Küçük and Kivanç, 2005; Marcello et al., 2010). Varios autores señalan que la presencia masiva de poblaciones de *Trichoderma* spp. en áreas de producción agrícola, está asociada a la disminución de daños provocados por fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* y *Pythium* spp., debido entre varios aspectos a una alta actividad enzimática de quitinasas y glucanasas con características quitinolítica y glucanolítica sobre paredes celulares; además, actúan inhibiendo la germinación de esporas de dichos fitopatógenos (Harman, 2000; El-Katatny et al., 2001).

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

Cepa	Especie	Actividad total (μmol glucosa $\cdot\text{h}^{-1}$)	Actividad específica (μmol glucosa $\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ proteína)
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	2,62 a	70,51 a
Ta10	<i>T. asperellum</i>	2,35 ab	65,35 ab
Ta9	<i>T. asperellum</i>	2,24 b	54,44 b
Ta6	<i>T. asperellum</i>	1,78 c	36,72 c
Ta11	<i>T. asperellum</i>	1,54 d	22,31 d

Medias que no comparten una misma letra por columnas son estadísticamente diferentes entre sí (Tukey, $P\leq 0,05$)

Ensayo de antibiosis. Los resultados obtenidos permitieron observar que todos los filtrados provenientes de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp. generaron una inhibición sustancial del crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *P. parasitica* en comparación con el testigo. Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre cepas para ambas enzimas. En el caso de quitinasas, los valores de inhibición de *F. oxysporum* oscilaron entre 33,6 a 97,35 %, siendo el aislado Ta9 que manifestó los mejores resultados; la inhibición de *P. parasitica* fue más intensa y osciló entre 48,02 y 98,22 %, en este caso el aislado Ta9 también resultó ser el más efectivo (Cuadro 3). Por su parte, aunque en el bioensayo de glucanasas todos los filtrados de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp. presentaron

inhibiciones significativas en comparación con el testigo, hubo variación entre aislados con respecto al biocontrol de los fitopatógenos utilizados; en el caso de *F. oxysporum*, los porcentajes de inhibición oscilaron entre 47,6 y 98 %, siendo el aislado Ti14 el mejor, seguido del Ta10 y Ta9 con 95,7 y 93,5 % respectivamente; en contraste, para el caso de *P. parasitica* los porcentajes de inhibición estuvieron entre 71,6 y 92,9 %, donde Ta9 y Ta11 fueron los más efectivos, y Ti14 junto con Ta10 mostraron los menores porcentajes de control (Cuadro 4). Lo anterior sugiere diferencias en la actividad enzimática entre aislados y su especificidad según el patógeno objetivo que presentan características estructurales de paredes celulares particulares (quitina para el caso de *F. oxysporum* y glucanos en el caso de *P. parasitica*).

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

Cepa	Especie	Inhibición de <i>F. oxysporum</i> (%)	Inhibición de <i>P. parasitica</i> (%)
Ta9	<i>T. asperellum</i>	97,35 a	98,22 a
Ta6	<i>T. asperellum</i>	57,17 b	74,37 b
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	48,87 c	68,02 c
Ta11	<i>T. asperellum</i>	44,62 d	56,30 d
Ta10	<i>T. asperellum</i>	33,60 e	48,02 e

Medias que no comparten una misma letra por columnas son estadísticamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0,05$)

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

Cepa	Especie	Inhibición de <i>F. oxysporum</i> (%)	Inhibición de <i>P. parasitica</i> (%)
Ti14	<i>T. inhamatum</i>	98,03 a	75,75 c
Ta10	<i>T. asperellum</i>	95,75 ab	73,92 cd
Ta9	<i>T. asperellum</i>	93,55 b	97,62 a
Ta6	<i>T. asperellum</i>	76,05 c	71,65 d
Ta11	<i>T. asperellum</i>	47,62 d	92,92 b

Medias que no comparten una misma letra por columnas son estadísticamente diferentes entre sí (Tukey, $P \leq 0,05$)

Los hallazgos anteriores son similares a los encontrados por Aceves et al. (2004) quienes observaron antibiosis de *Trichoderma* spp. sobre aislados de *F. oxysporum* y *F. subglutinans* con inhibición del crecimiento del micelio en un rango de 1,0 a 47,6 %, además encontraron que los aislados de *T. longibrachiatum* (Ti-14 y Ti-16), *T. harzianum* (Thzcf-12 y Thz-8) y *T. koningii* (Tkcf-1) produjeron mayor cantidad de 6-pentil- α -pirona

en los cultivos líquidos y mayor efecto *in vitro* con valores de inhibición de 36,6-47,6 y 32,0-42,6 % para *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, respectivamente. Parcialmente concordante con lo encontrado en el presente estudio, Martínez et al. (2008) evaluaron y seleccionaron 59 aislados de *Trichoderma* spp. con potencial para su formulación como biofungicidas en el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz reportaron que el 90 % de

los aislados se ubicaron en grado 1 y 2 de la escala de Bell et al. (1982), lo que indica una excepcional capacidad inhibitoria; también, señalaron que múltiples aislados presentaron una eficacia de control en condiciones semicontroladas de campo superior al 80 %.

En otro estudio, Reyes et al. (2008) evaluaron la actividad antagonica *in vitro* de trece aislados de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. y encontraron que todos los aislados presentaron un alto porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno; adicionalmente a esto, se evaluó la eficacia técnica sobre el patógeno y los resultados mostraron alta capacidad antagonica, con diferentes tipos de interacción hifal (lisis, vacuolización, enrollamiento y penetración) y alrededor del 50 % de efectividad técnica en tres aislados del agente controlador.

Cabe mencionar que de manera consistente el aislado Ta9 de *Trichoderma asperellum* produjo porcentajes de inhibición mayores al 90 % en ambos ensayos para los dos patógenos analizados, por lo que podría ser una opción potencial para la formulación de un producto de control biológico de enfermedades en el cultivo de jamaica para las regiones productoras de Guerrero, México. Los mecanismos del antagonismo de *Trichoderma* spp. son variados e incluye la competencia por sustrato, espacio y nutrientes, el micoparasitismo como una simbiosis antagonica entre organismos, la producción de compuestos inhibidores, la inactivación de enzimas del agente patógeno, inducción de resistencia (SIR), la producción de enzimas líticas y otros metabolitos secundarios con actividad micotóxica y antagonica (antibiosis) (Gajera et al., 2013; Abo et al., 2014; Contreras et al., 2016). Esta actividad antifúngica involucra la producción de proteasas, celulasas, quitinasas y glucanasas que afectan la integridad de las membranas fungosas y la degradación de la pared celular de los hongos (Hoyos et al., 2008; Negrete, 2012; Guigón et al., 2014).

En el caso de Oomycetes, cuya pared celular contiene β -1,3-glucano y celulosa, se sugiere la β -1,3-glucanasa como la enzima principal en la lisis de la pared celular durante la acción micoparasítica (Michel et al., 2005). Similar a lo reportado en la presente investigación, múltiples cepas de *Trichoderma* spp. tienen potencial como agentes de control biológico afectando el

desarrollo de un amplio espectro de fitopatógenos foliares y del suelo como *R. solani*, *Colletotrichum* spp., *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum*, *P. parasitica*, *P. ultimum* y *Verticillium* spp. (Oros y Naár, 2017; Sunpapao et al., 2018; Baiyee et al., 2019). De acuerdo con nuestros resultados, *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma inhamatum* son especies con un amplio espectro de control y con la habilidad de sintetizar enzimas hidrolíticas (quitinasas y glucanasas) involucradas en la inhibición de dichos patógenos (González et al., 2012; Guigón et al., 2014; Jeyaseelan et al., 2012).

Es importante complementar esta investigación en fase de campo; sin embargo, basados en los resultados reportados, se recomienda el uso del aislado Ta9 de *Trichoderma asperellum* para su formulación en productos de control biológico que se incorporen en un sistema de manejo integrado y ecológico fitosanitario en el cultivo de jamaica (*H. sabdariffa*) en Guerrero.

Análisis de regresión. Mediante el análisis de regresión lineal (Figura 1) pudo observarse una estrecha relación entre la concentración de glucanasas, quitinasas y el porcentaje de inhibición de los agentes patogénicos. La relación entre la concentración de la actividad específica de quitinasas y los porcentajes de inhibición presentaron un comportamiento exponencial (Figura 1A,B); por otra parte, en el caso de las glucanasas se presentó un comportamiento de tipo logístico (Figura 1C,D). Cabe mencionar que la regresión entre las glucanasas y el porcentaje de inhibición de *P. parasitica* solamente fue significativa para el caso de actividad total de la enzima.

Estos resultados son comparativos a los reportados por Quecine et al. (2008) quienes encontraron una correlación positiva ($r = 0,65-0,79$) entre la producción quitinolítica de *Streptomyces* spp. procedente de cítricos y antagonismo frente a *Colletotrichum sublineolum*, *Guignardia citricarpa*, *R. solani* y *F. oxysporum*. Análogo a lo reportado en el presente estudio, Küçük y Kivanç (2005) estudiaron las interacciones *in vitro* entre cepas de *Trichoderma harzianum* y algunos fitopatógenos del suelo (*Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*, *Fusarium culmorum* y *F. moniliforme*), reportaron que todas las cepas de *T. harzianum* probadas

produjeron alta actividad enzimática de β -1,3 glucanasas y quitinasas, dichos metabolitos

inhibieron significativamente el crecimiento de los hongos patógenos.

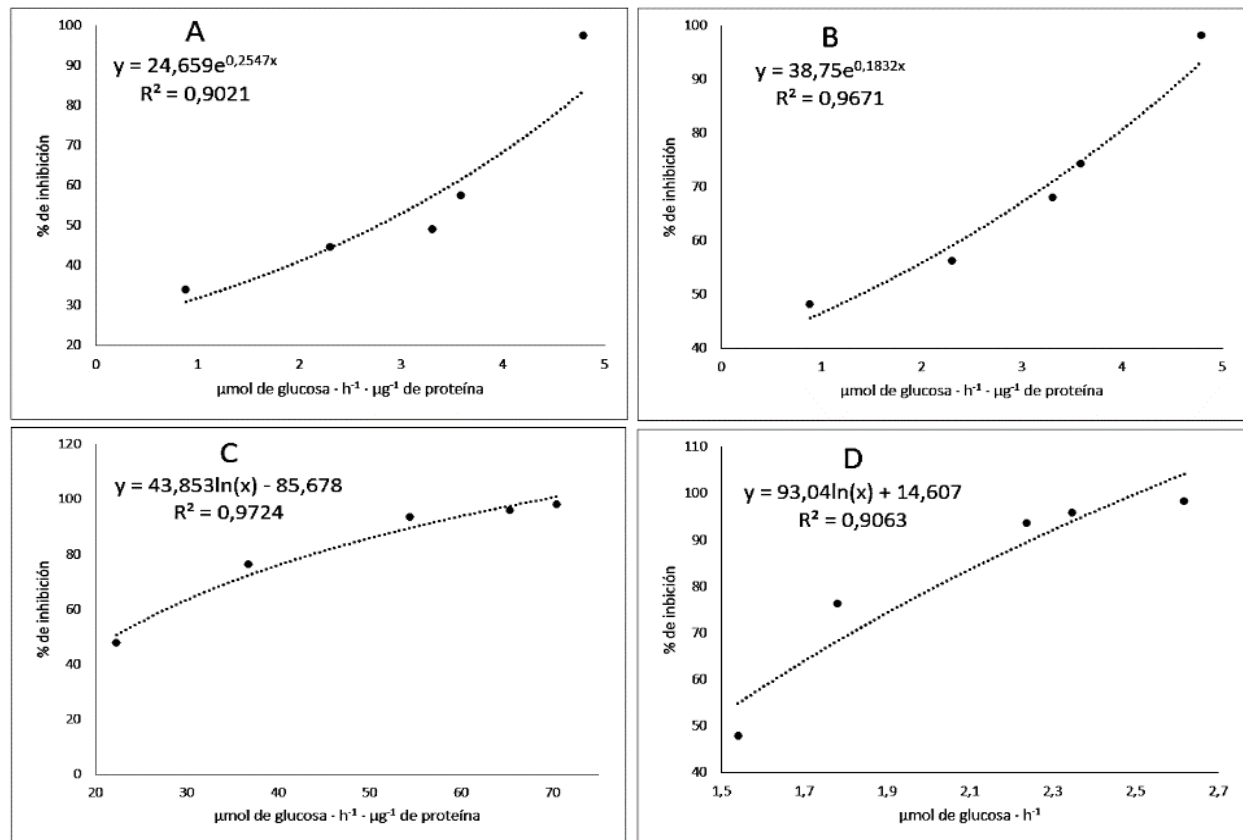


Figura 1. Análisis de regresión entre la actividad enzimática y el porcentaje de inhibición del patógeno. A. Actividad específica de quitinasas e inhibición de *F. oxysporum*; B. Actividad específica de quitinasas e inhibición de *P. parasitica*; C. Actividad específica de glucanasas e inhibición de *F. oxysporum*; D. Actividad total de glucanasas e inhibición de *P. parasitica*

CONCLUSIONES

Todas las cepas analizadas (Ti14 Ta10, Ta11, Ta6 y Ta9) fueron capaces de producir enzimas líticas (glucanasas y quitinasas), mostrando valores heterogéneos, aún entre cepas de la misma especie. El aislado Ta9 de *Trichoderma asperellum* produjo la mayor actividad de quitinasas, mientras que el aislado Ti14 de *Trichoderma inhamatum* superó a las demás en la actividad de glucanasas. Todos los filtrados de las cepas de *Trichoderma* spp. presentaron porcentajes de inhibición significativos. Se detectó una relación directa y significativa entre la actividad enzimática y la inhibición del crecimiento de los filtrados de *Trichoderma* spp. sobre los agentes patógenos. El aislado Ta9

presentó de forma consistente los mejores resultados por lo que se recomienda para su formulación en productos de control biológico y su incorporación en sistemas de manejo integrado del cultivo de jamaica en Guerrero, México. Este estudio sirve como base para el desarrollo de tecnologías de control biológico de enfermedades mediante el aislamiento y evaluación de cepas nativas de agentes de biocontrol en otras regiones productoras y para múltiples cultivos.

LITERATURA CITADA

1. Abo-Elyousr, K.A., S.I. Abdel-Hafez y I.R. Abdel-Rahim. 2014. Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri*. Journal of

- Phytopathology 162(9): 567-574.
2. Aceves A., C.M., M.A.O. Sánchez, O.R. Domínguez y R.L. Gutiérrez. 2004. Producción y actividad antibiótica del 6 pentil-a-pirona de *Trichoderma* spp. sobre especies de *Fusarium*. Revista Mexicana de Fitopatología 22(1): 14-21.
 3. Adams, D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. Microbiology 150(7): 2029-2035.
 4. Alarcón Cruz, N. y J.P. Legaria Solano. 2013. Caracterización morfológica de una muestra etnográfica de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Revista Chapingo. Serie Horticultura 19(1): 85-98.
 5. Baiyee B., C. Pornsuriya, S.I. Ito y A. Sunpapao. 2019. *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aerea*. Biological Control 129: 195-200.
 6. Bara M., T.F., A.L. Lima y C.J. Ulhoa. 2003. Purification and characterization of an exo- β -1, 3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. FEMS Microbiology Letters 219(1): 81-85.
 7. Barnett L. H. y Hunter B. B. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218p
 8. Bell, D.K., H.D. Wells y C.R. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72(4): 379-382.
 9. Bhale, U.N., P.M. Wagh y 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(1): 5-11.
 10. Bobadilla-Carrillo, G.I., M.G. Valdivia-Reynoso, M.L. Machuca-Sánchez, R. Balois-Morales y L. González-Torres. 2016. Factores precosecha, cosecha y poscosecha inherentes al cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Revista Bio Ciencias 3(4): 256-268.
 11. Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium* CMI Kew. Sur. England.
 12. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72(1-2): 248-254.
 13. Contreras-Cornejo, H.A., L. Macías-Rodríguez, E. del-Val y J. Larsen. 2016. ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. FEMS Microbiology Ecology 92(4): fiw036.
 14. El-Katatny, M., M. Gudelj, K.H. Robra, M. Elnaghy y G. Gübitz. 2001. Characterization of a chitinase and an endo- β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. Applied Microbiology and Biotechnology 56(1-2): 137-143.
 15. FAOSTAT, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2019. http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E (consulta de Noviembre 28, 2020).
 16. Gajera, H., R. Domadiya, S. Patel, M. Kapopara y B. Golakiya. 2013. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system-a review. Curr. Res. Microbiol. Biotechnol. 1: 133-142.
 17. Gallegly, M.E. y C. Hong. 2008. Phytophthora: Identifying species by morphology and DNA fingerprints. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 158 p.
 18. González, I., D. Infante, B. Martínez, Y. Arias, N. González, I. Miranda y B. Peteira. 2012. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. Biotecnología Aplicada 29(1): 12-16.
 19. González I., D. Infante, B. Peteira, B. Martínez, Y. Arias, N. González y I. Miranda. 2010. Caracterización bioquímica de aislados de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. I. Expresión de actividad quitinasa. Revista de Protección Vegetal 25(1): 58-63.
 20. Guigón-López, C., V. Guerrero-Prieto, S. Lanzuise y M. Lorito. 2014. Enzyme activity of extracellular protein induced in *Trichoderma asperellum* and *T. longibrachiatum* by substrates based on *Agaricus bisporus* and *Phymatotrichopsis*

- omnivora*. Fungal Biology 118(2): 211-221.
21. Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84(4): 377-393.
 22. Harman, G.E. 2011. *Trichoderma*-not just for biocontrol anymore. Phytoparasitica 39(2): 103-108.
 23. Harman, G.E., C.K. Hayes, M. Lorito, R.M. Broadway, A.C. Peterbauer y A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology 83(3): 313-318.
 24. Hoyos-Carvajal, L., P. Chaparro, M. Abramsky, I. Chet y S. Orduz. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. Agronomía Colombiana 26(3): 451-458.
 25. Infante, D., B. Martínez, N. González y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal 24(1): 14-21.
 26. Jeyaseelan, E.C., S. Tharmila y K. Niranjan. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato damping off. Archives of Applied Science Research 4(4): 1623-1627.
 27. Kroon, L. P., H. Brouwer, A. W. de Cock y F. Govers. 2012. The genus *Phytophthora* Anno 2012. Phytopathology 102(4): 348-364.
 28. Küçük, Ç. y M. Kivanç. 2005. *In vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. Turkish Journal of Biology 28(2-4): 111-115.
 29. Larroque, M., E. Belmas, T. Martinez, S. Vergnes, N. Ladouce, C. Lafitte y B. Dumas. 2013. Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity and resistance to the root pathogen *Phytophthora parasitica* in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany 64(12): 3615-3625.
 30. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193: 265-275.
 31. Marcello, C.M., A.S. Steindorff, S.P. da Silva, R. do Nascimento Silva, L.A.M. Bataus y C.J. Ulhoa. 2010. Expression analysis of the exo- β -1, 3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. Microbiological Research 165(1): 75-81.
 32. 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. Revista de Protección Vegetal 23(2): 118-125.
 33. Meléndez-Monroy M., S. Aranda-Ocampo, G. Carrillo-Castañeda, J. Hernández-Morales y L. Soto-Rojas. 2016. Rizobacterias nativas en jamaica antagonistas a *Phytophthora parasitica* Dastur: aislamiento y caracterización. Revista Fitotecnia Mexicana 39(2): 151-158.
 34. Michel-Aceves, A.C., M.A. Otero-Sánchez, L. Y. Solano-Pascacio, R. Ariza-Flores, A. Barrios-Ayala y A. Rebolledo-Martínez. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la "Escoba de bruja" del mango (*Mangifera indica* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 27(1): 18-26.
 35. 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(2): 273-278.
 36. Mohiddin, F.A., M.R. Khan, S.M. Khan y B.H. Bhat. 2010. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites?. Plant Pathology Journal (Faisalabad) 9(3): 92-102.
 37. Negrete, P.S. 2012. Análisis del modo de acción de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* sp. Tumbaga, 2(7): 3.
 38. Oros, G. y Z. Naár. 2017. Mycofungicide: *Trichoderma* based preparation for foliar

- applications. American Journal of Plant Sciences 8(2): 113-125.
39. Ortega-Acosta S. Á., J. Hernández-Morales, J. S. Sandoval-Islas, V. Ayala-Escobar, L. Soto-Rojas y A. Alejo-Jaimes. 2015. Distribución y frecuencia de organismos asociados a la enfermedad "pata prieta" de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Revista Mexicana de Fitopatología 33(2): 173-194.
40. Osorio-Hernández E., J. Hernández-Morales, V. Conde-Martínez, A. C. Michel-Aceves, J. A. Lopez-Santillan y J. A. Torres-Castillo. 2016. *In vitro* activities of *Trichoderma* species against *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. African Journal of Microbiology Research 10(15): 521-527.
41. Pittner, E., J. Marek, D. Bortuli, A. Knob, P.R. Da Silva, C.R. Gobatto, L. Alvarenga-Santos y C.D. Rios-Faria. 2019. Fungi with enzymatic action against fungal diseases and growth promoting in wheat. Bioagro 31(1): 55-66.
42. Quecine, M.C., W.L. Araujo, J. Marcon, C.S. Gai, J.L. Azevedo y A.A. Pizzirani-Kleiner. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. Letters in Applied Microbiology 47(6): 486-491.
43. Ramada, M.H.S., F.Á C. Lopes, C.J. Ulhoa y R. do Nascimento Silva. 2010. Optimized microplate β -1, 3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. Journal of Microbiological Methods 81(1): 6-10.
44. Ramot O., R. Cohen-Kupiec y I. Chet. 2000. Regulation of β -1, 3-glucanase by carbon starvation in the mycoparasite *Trichoderma harzianum*. Mycological Research 104(4): 415-420.
45. Reyes, Y., B. Martínez y D. Infante. 2008. Evaluación de la actividad antagónica de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. Revista de Protección Vegetal 23(2): 112-117.
46. Romero-Cortes, T., P.A. López-Pérez, M. Ramírez-Lepe y J.A. Cuervo-Parra. 2016. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences 32(1): 32-45.
47. SAS Online doc copyright. (2010). SAS Institute Cary, NC, USA.
48. SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2020. Cierre de ciclo de producción agrícola. fuente: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (consulta de Noviembre 23, 2020).
49. SMN. 2018. Servicio meteorológico nacional. Comisión Nacional del Agua. Normales climatológicas. Período (1981-2015). <https://smn.conagua.gob.mx/es/> (consulta de Diciembre, 2018).
50. Sunpapao, A., T. Chairin y S.I. Ito. 2018. The biocontrol by *Streptomyces* and *Trichoderma* of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* in oil palm seedlings. Biological Control 123: 36-42.
51. Veena, G. A. y N. E. Reddy. 2014. Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia bataticola*, the causal agent of dry root rots of chickpea. Int. J. of Plant, Animal and Environmental Sci. 4(1): 78-81.

