

Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg (Ta13-17) contra hongos patógenos de *Solanum lycopersicum* L.



In vitro antagonism of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg (Ta13-17) against phytopathogenic fungi of *Solanum lycopersicum* L.

<https://eqrcode.co/a/196hul>

✉Sandy Esther Celis-Perera, ✉Felicia Amalia Moo-Koh, ✉Arturo Reyes-Ramirez,
✉José María Tun Suárez, ✉Jairo Cristóbal-Alejo *

Tecnológico Nacional de México/ I.T. Conkal, Av. Tecnológico s/n 97345, Conkal, Yucatán, México.

RESUMEN: *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg (Ta13-17) es un habitante natural del suelo que presenta cualidades como controlador biológico de patógenos fúngicos. Posee mecanismos con efecto antagonístico, como son la competencia por espacio y nutrientes, la producción de metabolitos secundarios y enzimas líticas relacionadas con antibiosis y micoparasitismo, respectivamente. El objetivo del estudio fue determinar, *in vitro*, la capacidad de biocontrol de la cepa nativa *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg (Ta13-17) contra hongos patógenos aislados de *Solanum lycopersicum* L. Se enfrentó a *T. asperellum* contra cinco hongos fitopatógenos aislados de tomate, en placas Petri con medio PDA en cultivo dual. Se calcularon el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) y el grado de micoparasitismo. Para calcular la antibiosis, se preparó cultivo PDA en combinación con filtrado líquido de *T. asperellum*. Se sembró un disco de micelio de cada fitopatógeno y se determinaron ICM, inhibición de esporulación y germinación de conidios. Adicionalmente, se evaluó la producción de quitinasas y glucanasas de *T. asperellum* en medio mínimo. El diseño experimental fue completamente al azar. Los tratamientos en cada experimento se compararon mediante análisis de varianza seguido de la prueba de Tukey para $p < 0,05$. Los datos se procesaron en el paquete estadístico InfoStat. La cepa exhibió actividad enzimática de quitinasas y glucanasas desde el tercer día posterior a la siembra e inhibió el crecimiento de los hongos fitopatógenos en, al menos, 55 %. Se produjo 100 % de micoparasitismo en *C. lunata* (ITC22) y *A. alternata* (ITC24) al onceavo día; mientras que, en el resto de los fitopatógenos, se tuvo al menos 92,05 %. Las pruebas de antibiosis mostraron 100 % ICM para *F. equiseti* (ITC32) y 100 % de inhibición de esporulación y germinación de conidios en *C. cassiicola* (ITC23), *A. alternata* (ITC24) y *F. equiseti* (ITC32).

Palabras clave: actividad enzimática, antibiosis, competencia, control biológico, fitopatógenos, micoparasitismo.

ABSTRACT: *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg (Ta13-17) is a natural inhabitant of the soil that presents qualities as a biological control of fungal pathogens. It has mechanisms with antagonistic effects such as competition for space and nutrients, production of secondary metabolites, and lytic enzymes related to antibiosis and mycoparasitism. The objective was to evaluate the *in vitro* biocontrol capacity of the native strain *T. asperellum* (Ta13-17) against pathogenic fungi isolated from *Solanum lycopersicum* L. In dual culture in Petri dishes containing PDA, *T. asperellum* was confronted against five phytopathogenic fungi isolated from tomato. The percentage of inhibition of mycelial growth (ICM) and the degree of mycoparasitism were calculated. To calculate the antibiosis, ICM, sporulation inhibition and germination of conidia were determined in mycelium disks of each phytopathogen grown on PDA medium with liquid filtrate of *T. asperellum* added. Additionally, chitinase and glucanase production by *T. asperellum* was evaluated in minimal medium. A completely randomized design was used. The antagonist exhibited chitinase and glucanase activities from day three after sowing and inhibited growth of the phytopathogenic fungi at least 55 %. On the eleventh day, 100 % mycoparasitism was observed in *C. lunata* (ITC22) and *A. alternata* (ITC24); the rest of the phytopathogens showed at least 92,05 %. Antibiosis tests showed 100 % ICM for *F. equiseti* (ITC24) and 100% inhibition of sporulation and germination of conidia in *C. cassiicola* (ITC23), *A. alternata* (ITC23), and *F. equiseti* (ITC32).

Keywords: enzymatic activity, antibiosis, competition, biological control of phytopathogens, mycoparasitism.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es de las hortalizas más consumidas y de mayor área cultivada a nivel mundial. La incidencia de enfermedades de etiología fungosa es una constante para su cultivo. Para

su control, es común la aplicación de fungicidas sintéticos; sin embargo, existe una creciente necesidad de desarrollar productos alternativos para el manejo de estas y otras enfermedades, que ofrezcan un control fácil y económicamente viable (1, 2).

*Correspondencia a: Jairo Cristóbal-Alejo. E-mail: jairoca54@hotmail.com

Recibido: 03/02/2021

Aceptado: 20/07/2021

Entre los microorganismos del suelo con mayor estudio utilizados en el control biológico de enfermedades sobresalen las especies de *Trichoderma*; estas son cosmopolitas, habitantes naturales del suelo, saprófitas, que se caracterizan por su plasticidad biológica y por evidenciar acción antagonista hacia hongos fitopatógenos (3, 4). *Trichoderma* spp. ejerce biocontrol sobre diferentes hongos patógenos de plantas como *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp., entre otros (5).

En la agricultura, se utilizan especies de *Trichoderma* como biofungicidas comerciales, debido a su competencia microbiana y a la colonización que ejercen en la rizosfera, ya que limitan el nicho ecológico de hongos fitopatógenos (6). Además, estudios en especies nativas de *Trichoderma* demuestran mayor efectividad que los productos comerciales en el control de fitopatógenos. Dicho efecto se atribuye a la producción de metabolitos y enzimas líticas relacionadas con el efecto de antibiosis y micoparasitismo (7). El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la capacidad de biocontrol de la cepa mexicana Ta13-17 de *Trichoderma asperellum* contra hongos patógenos aislados de *S. lycopersicum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material fúngico pertenece al cepario del Laboratorio de Fitopatología del Tecnológico Nacional de México/Campus Conkal, Yucatán, México, con ubicación geográfica de 21° 4' N y 89° 31' O. Las cepas se encontraban en conservación en medio de cultivo (Papa-Dextrosa-Agar más aceite mineral) y bajo condiciones de laboratorio (28±2°C, luz/oscuridad durante 8-16 h). Se utilizaron cinco hongos fitopatógenos *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (ITC22), *Corynespora cassiicola* Berk. & M.A. Curtis (ITC23), *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl (ITC24), *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. (ITC32) y *Fusarium oxysporum* Smith & Swingle (ITC33); aislados de diferentes órganos de *S. lycopersicum*.

Como antagonista se utilizó la cepa mexicana *Trichoderma asperellum* (Ta13-17), previamente aislada de raíz y tallo de chile (*Capsicum annuum* L.) cv. Criollo; la cual cuenta con estudios previos de actividad antagonista y promotora de crecimiento vegetal (información no publicada) y cuya secuencia genética se encuentra en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Competencia por espacio en cultivos duales

Para comparar la velocidad de crecimiento entre el antagonista y los fitopatógenos, a partir de monocultivos fúngicos con siete días de crecimiento, se tomaron discos de micelio (5 mm de diámetro) de las cepas en estudio; se depositaron en puntos equidistantes en

placas Petri (90 mm de diámetro) que contenían medio de cultivo PDA. Se consideraron cuatro réplicas por hongo fitopatógeno en enfrentamiento dual y los respectivos controles sin el antagonista; el crecimiento micelial se registró durante 13 días (8).

Las placas se mantuvieron a 28±2°C bajo un régimen de luz/oscuridad durante 8-16 horas, se tomó el registro del crecimiento a partir del segundo día de la siembra (9). Para calcular la competencia, se determinó la inhibición del crecimiento micelial (ICM) con la fórmula $PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$

Donde:

PICR: porcentaje de inhibición del crecimiento radial

R1: radio del patógeno testigo

R2: radio del patógeno (10).

Micoparasitismo

Para estimar el porcentaje de micoparasitismo de *T. asperellum* Ta13-17 sobre los hongos fitopatógenos, se utilizó el procedimiento indicado en competencia por espacio en cultivos duales. Cuando el antagonista sobrecreció la cepa del patógeno (onceavo día), se comparó con la escala propuesta por Bell *et al.* (11) de cinco clases, a las que se les asignaron valores en porcentaje: 1=100 %; 2=92,05 %; 3=50 %; 4=7,95 % y 5=0 %, obtenidas con el programa 2LOG v. 1.0. (12).

Antibiosis

Para determinar la capacidad de inhibición del crecimiento micelial (ICM) de los fitopatógenos, causada por metabolitos no volátiles producidos por el antagonista, se dejó crecer a *T. asperellum* Ta13-17 en medio de cultivo caldo de papa más dextrosa (PDB) durante 21 días; posteriormente, se filtró a través de una gasa estéril. El filtrado se colocó en tubos Falcón de 50 ml, se centrifugó cuatro veces (20 minutos, 3000 rpm) y se recuperó el sobrenadante en un matraz de 500 ml. Para eliminar las esporas del antagonista, el filtrado se pasó tres veces a través de un filtro millipore de 0,22 µm. Este filtrado se usó en la preparación de medio PDA (1:1 V/V). La incorporación del filtrado al medio PDA se realizó antes que solidificara. En el centro de la placa Petri se sembró un disco de micelio de 5 mm de cada cepa de los fitopatógenos de siete días de crecimiento (13).

Cada cepa del hongo fitopatógeno se consideró como tratamiento con cuatro repeticiones, con sus respectivos testigos sembrados en medio PDA sin adición del filtrado. Las placas se incubaron a una temperatura entre 28±2°C. Se midió el radio de crecimiento de los fitopatógenos cada tres días hasta que los testigos llenaron las placas.

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial se estimó con la fórmula propuesta por Samaniego (10).

Se determinó la esporulación en los tratamientos donde hubo crecimiento micelial del hongo fitopatógeno. Para ello se agregaron 10 ml de agua destilada estéril y se realizó un raspado de micelio con un portaobjetos; se filtró a través de una gasa, se tomaron 10 µl de la solución de esporas y los conidios se contaron en una cámara Neubauer. Se calculó el porcentaje de inhibición de esporulación (IE) con la fórmula
$$\%IE = \frac{Test - Trat}{Test} \times 100$$

Donde

IE = Inhibición de esporulación

Test = Número de conidios sin filtrado

Trat = Número de conidios con filtrado.

Para determinar la inhibición de germinación de los conidios (IGC), se consideraron 100 conidios incorporados en placas Petri de 9 cm de diámetro, que contenían medio de cultivo PDA y filtrado de *T. asperellum* Ta13-17, así como 100 conidios en placas Petri solo con PDA como testigo. Se contabilizó el número de conidios germinados a las 48 h posteriores a la siembra (13).

Actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática de quitinasas y glucanasas de la cepa *T. asperellum* Ta13-17, en medio de cultivo mínimo (0,24 g de MgSO₄·7H₂O; 0,24 g de KCl; 1,2 g de NH₄NO₃; 0,0024 g de ZnSO₄·7H₂O; 0,0024 g de MgCl₂·7H₂O; 1,08 g de K₂HPO₄; 0,0024 g de FeSO₄·7H₂O), pH 5,6 ± 2. Se utilizaron matraces de 125 ml con 30 ml de medio y 3 µl de cloranfenicol.

Para la inducción de quitinasas se agregó 1 % de quitina coloidal y 0,5 % de micelio seco de *Fusarium equiseti* ITC32 para las glucanasas (14). Se inoculó 1 ml de una suspensión de conidios de *T. asperellum* Ta13-17 a una concentración de 1 x 10⁶ conidios.ml⁻¹; se incubó a 28°C, 12 horas luz/oscuridad y 60 % de humedad relativa, en un agitador rotatorio a 110 rpm. Se tomaron muestras del cultivo a los 3, 5 y 7 días; se extrajeron 10 ml en cada día de evaluación. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos y se congelaron a -20°C hasta su uso (13).

Para la actividad de quitinasas, se recuperó 1 ml del sobrenadante de las muestras y se agregó 1 ml de quitina coloidal (sustrato), incubándose por 1 hora a 50°C. Posteriormente, se adicionó 1 ml de NaOH al 1 % y se centrifugó a 3 000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó 1 ml del sobrenadante y se agregó 1 ml de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (15). Para detener la reacción, se mezcló en vortex y se llevó a ebullición durante cinco minutos y se enfrió en hielo inmediatamente. Por último, se adicionaron 2 ml de agua destilada, se mezcló y se realizó la lectura en un espectrofotómetro (RAYLEIGH UV-2601) a 540 nm. La curva patrón se determinó con N-acetil glucosamina (NAG) a partir de una solución estándar de 1 mg.ml⁻¹.

Para determinar la actividad de glucanasas, se tomaron 250 µl de laminarina a 0,5 % disuelta en buffer de acetato de sodio (0,05 M; pH 5) y se agregaron 250 µl de la muestra; se incubó a 40°C durante 30 minutos. Posteriormente, se detuvo la reacción y se agregaron 500 µl de DNS, se llevó a ebullición durante cinco minutos, se enfrió y se agregó 1 ml de agua destilada, se agitó en vortex y se dio lectura en el espectrofotómetro a 540 nm, se comparó con la curva patrón a base de una solución estándar de 1 mg.ml⁻¹ de glucosa (16). Se reportaron las unidades de actividad enzimática de quitinasas (UQ) expresada como micromoles de N-acetilglucosamina y, para el caso de glucanasas (UG), expresada como µmoles de glucosa/minuto en las condiciones dadas de cada reacción, respectivamente.

Análisis de datos

La distribución de los tratamientos se hizo en un diseño experimental completamente al azar. Con la información que se obtuvo se realizaron análisis de varianza (ANDEVA) y, cuando hubo diferencias estadísticas significativas, se hizo una comparación de medias con el método de Tukey ($p \leq 0,05$). Los datos en porcentaje se transformaron mediante la función de arcoseno: $\arcseno \sqrt{\frac{y}{100}}$. Los análisis se hicieron en el paquete estadístico InfoStat Ver. Libre.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Competencia y micoparasitismo

T. asperellum Ta13-17 alcanzó la mayor superficie de crecimiento desde el día tres de la siembra (Fig. 1), seguido por *C. lunata* (ITC22), que logró el máximo crecimiento hasta el día siete. Los hongos *F. oxysporum* (ITC33), *C. cassicola* (ITC23), *F. equiseti* (ITC32) y *A. alternata* (ITC24) presentaron crecimiento lento en comparación con el antagonista, incluso no alcanzaron a cubrir por completo el espacio en el que crecen. *A. alternata* (ITC24) presentó el menor crecimiento con 3,24 cm de radio.

La prevalencia de las especies de *Trichoderma* en distintos sustratos y ambientes muestra la capacidad y su plasticidad biológica para competir por recursos nutricionales, lo que favorece su tasa de crecimiento en diferentes sustratos (6).

Al quinto día de evaluación, el mayor porcentaje de inhibición micelial fue en *A. alternata* (ITC24) y en *F. oxysporum* (ITC33) (Tabla 1). En un estudio con dos aislados de *T. asperellum* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn y *Fusarium oxysporum* Smith & Swingle, los porcentajes de inhibición en el crecimiento micelial fueron de 49, 53 y 84 %, respectivamente (17).

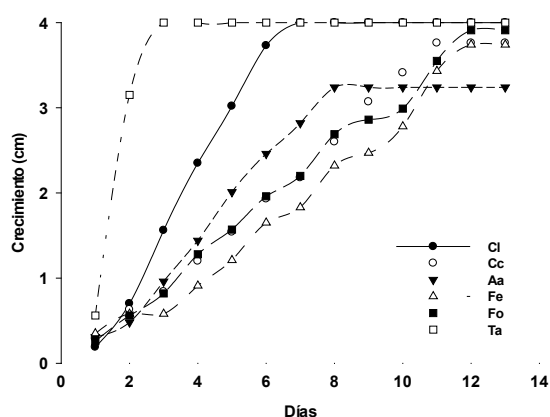


Figura 1. Cinética de crecimiento de *T. asperellum* Ta13-17 y hongos patógenos de tomate. (Ta: *T. asperellum* (Ta13-17), Cl: *C. lunata* (ITC22), Cc: *C. cassiicola* (ITC23), Aa: *A. alternata* (ITC24), Fe: *F. equiseti* (ITC32) y Fo: *F. oxysporum* (ITC33)). / *Growth kinetics of T. asperellum Ta13-17 and pathogenic tomato fungi. (Ta: T. asperellum (Ta13-17), Cl: C. lunata (ITC22), Cc: C. cassiicola (ITC23), Aa: A. alternata (ITC24), Fe: F. equiseti (ITC32), and Fo: F. oxysporum (ITC33)).*

Los resultados de otros autores con estudios en *Trichoderma* spp. estimaron inhibiciones entre 70 y 76 % en el crecimiento micelial de los fitopatógenos *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn y *M. phaseolina* (Tassi) Goid (18, 19). En otro trabajo evaluaron cinco especies de *Trichoderma* contra *C. gloeosporioides* y observaron, con *T. asperellum* y *T. longibranchiatum* Rifai, inhibiciones en crecimiento micelial con valores de 22,5 y 21,9 %, en su orden (20). En el mismo contexto, un estudio indicó con otra cepa de *T. asperellum* efectividad antagónica contra distintas cepas de *Fusarium* aisladas de melón, con inhibiciones miceliales del 54,9 al 74,1 % (21).

En condiciones adversas, el género *Trichoderma* está adaptado para colonizar sustratos y sobrevivir en forma de clamidosporas, lo que le da una ventaja en la competencia por espacio y nutrientes contra otros microorganismos (22).

En el micoparasitismo de *T. asperellum* Ta13-17, se tuvieron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,01$). En *C. lunata* (ITC22) y *A. alternata* (ITC24) se registró 100 %; el antagonista cubrió, creció y es-

poruló por encima de estos hongos fitopatógenos. En el resto de las especies fitopatógenas: *C. cassiicola* (ITC23), *F. equiseti* (ITC32) y *F. oxysporum* (ITC33), el micoparasitismo fue de 92 al 94 %; el antagonista creció aproximadamente tres cuartas partes del medio de cultivo (Tabla 1).

En otro estudio, cepas de *Trichoderma* colonizaron 100 % de la superficie del medio con crecimiento sobre los siguientes fitopatógenos: *F. solani* (Mart.) Sacc, *F. oxysporum* (Mart.) Sacc y *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, 10 días después de la inoculación (18). También, una cepa de *T. asperellum* contra *F. oxysporum* ejerció micoparasitismo, lo que sugiere la consistencia de esta especie antagonista contra aislados de *Fusarium* (4).

El proceso micoparasítico de *Trichoderma* es complejo, ya que involucra el crecimiento quimiotrófico hacia el hongo fitopatógeno, estimulado por aminoácidos y azúcares, mediado por lectinas, seguido por la formación de estructuras especializadas, similares a los apresorios que contienen solutos osmóticamente como el glicerol, lo que facilita la penetración, la secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares y, con ello, la muerte del fitopatógeno (22).

Antibiosis

A partir del día seis de establecido el experimento, el filtrado libre de células de *T. asperellum* Ta13-17 causó inhibición de crecimiento en los hongos fitopatógenos en estudio. Solo en *C. cassiicola* (ITC23) no hubo inhibición de crecimiento micelial por encima del 50 %; en el resto de los fitopatógenos, la inhibición micelial fue superior al 80 % (Tabla 2).

En las siguientes evaluaciones en *C. lunata* (ITC22) y *F. equiseti* (ITC32) se mantuvo una inhibición de al menos 92 %.

Sin embargo, en *A. alternata* (ITC24) y *F. oxysporum* (ITC33), la actividad antifúngica del filtrado disminuyó. Estos resultados sugieren que los metabolitos secundarios en el medio de cultivo se volatilizaron e hizo que se perdiera efectividad en el transcurso del tiempo, incluso pudo estar asociado a una baja concentración de metabolitos en el medio de cultivo (22). Finalmente, en *C. cassiicola* (ITC23) no

Tabla 1. Antagonismo *in vitro* de la cepa mexicana Ta13-17 de *T. asperellum* sobre hongos fitopatógenos aislados de tomate a los 11 d. / *In vitro* antagonism of *T. asperellum* Ta13-17 on phytopathogenic fungi isolated from tomato.

Especie	Clave del aislado	ICM (%) 5 días	Micoparasitismo 11 días (%)
<i>C. lunata</i>	ITC22	44,93±1,01 b	100,00±0,00 a
<i>C. cassiicola</i>	ITC23	63,15±9,85 ab	92,05±0,00 b
<i>A. alternata</i>	ITC24	69,68±2,14 a	100,00±0,00 a
<i>F. equiseti</i>	ITC32	55,00±3,54 ab	94,70±1,87 b
<i>F. oxysporum</i>	ITC33	66,68±0,83 a	94,70±1,87 b
Testigos		0,00±0,00 c	0,00±0,00 c

Los datos son medias ± error estándar, letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $p \leq 0,05$); n = 4.

Data are means ± standard error, different letters in the same column indicate statistical differences (Tukey, $p \leq 0,05$); n = 4.

Tabla 2. Actividad antifúngica de filtrados de *T. asperellum* Ta13-17 sobre fitopatógenos aislados de tomate./Antifungal activity of *T. asperellum* Ta13-17 filtrate on phytopathogens isolated from tomato.

Especie	ICM (%)			IE (%)	IGC (%)
	6 días	9 días	12 días		
<i>C. lunata</i> ITC22	96,2±0,66 a	95,6±0,64 ab	92,9±0,61 a	NE	NE
<i>C. cassiicola</i> ITC23	47,6±3,35 c	40,7±2,62 d	55,5±1,58 d	100,00±0,00 a	100,00±0,00 a
<i>A. alternata</i> ITC24	81,8±0,00 b	88,9±0,00 b	75,0±2,19 b	100,00±0,00 a	100,00±0,00 a
<i>F. equiseti</i> ITC32	100,00±0,00 a	100,00±0,00 a	100,00±0,00 a	100,00±0,00 a	100,00±0,00 a
<i>F. oxysporum</i> ITC33	94,2±1,04 a	80,3±2,31 c	65,7±2,76 c	NE	NE
*Testigos	0,00±0,00 d	0,00±0,00 e	0,00±0,00 e	0,00±0,00 b	100,00±0,00 b

NE: no esporuló. Los datos son medias ± error estándar, letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $p \leq 0,05$); n = 4.

NE: did not sporulate. Data are means ± standard error, different letters in the same column indicate statistical differences (Tukey, $p \leq 0,05$); n = 4.

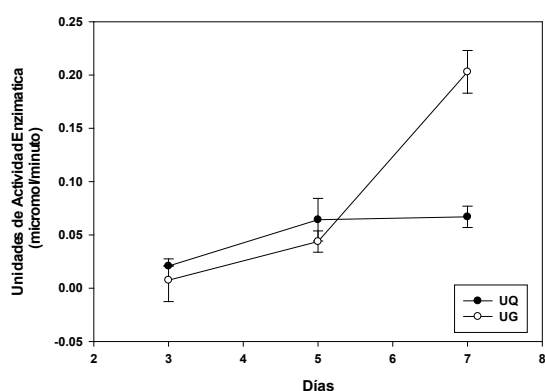


Figura 2. Actividad de quitinasas y glucanasas de *T. asperellum* Ta13-17, UQ: unidades quitinasas, UG: unidades glucanasas./ Chitinase and glucanase activity of *T. asperellum* Ta13-17, UQ: chitinase units, UG: glucanase units.

se observaron cambios en la inhibición del crecimiento micelial (Tabla 2). El filtrado del antagonista causó inhibición total en la esporulación y germinación de conidios, excepto en *C. lunata* (ITC22) y en *F. oxysporum* (ITC33). (Tabla 2)

En otro estudio con *F. oxysporum* se reportaron porcentajes de inhibición micelial superior al 40 % con dos de 25 filtrados de cepas de *Trichoderma*; las cepas que evaluaron fueron capaces de reducir al menos 30 % la germinación de conidios del patógeno (13).

La capacidad antagonista del género *Trichoderma* se debe, principalmente, a la producción de antibióticos como peptaibol, trichozianinas A1 y B1, con actividad inhibitoria en la germinación de esporas y en la elongación de hifas de hongos fitopatógenos (4).

La excreción de metabolitos difusibles en el entorno, por parte de *Trichoderma* spp., ocurre desde periodos muy tempranos de la interacción. Estos metabolitos secundarios son producto de un proceso celular estrictamente regulado, donde influyen las condiciones ambientales y la expresión de genes, controlado por interacciones con otros microorganismos, señalización de pH y complejos de proteínas (6).

Actividad enzimática

En ambos medios de cultivo se produjo actividad enzimática independiente del inductor utilizado. La producción de quitinasas se mantuvo constante en los tres días de evaluación. La actividad de glucanasas se incrementó en el día siete con 0,203 UG. Se tienen reportes con *T. asperellum* que la mayor actividad enzimática de glucanasas se produce cuando se tiene un medio con suplemento con pared celular del fitopatógeno; mientras que, la producción de quitinasas en medio enriquecido con quitina, alcanzó un máximo después de siete días de crecimiento y disminuyó a partir de entonces (23). La mayor producción de quitinasas por *Trichoderma* spp. en medio basal enriquecido con quitina se reportó al tercer y séptimo día de evaluación del cultivo (24). La mejor producción de glucanasas se reportó en el día uno y tres en medio basal enriquecido con gelatina (25).

La producción de estas enzimas para el día siete podría estar asociado con el inicio del micoparasitismo que ejerció *T. asperellum* Ta13-17 con los fitopatógenos cuando se confrontaron. Se encontró que, aproximadamente en el día siete de la confrontación, el antagonista y el fitopatógeno entran en contacto y comienza la actividad de micoparasitismo; para facilitar la penetración del antagonista las enzimas extracelulares, principalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, juegan un papel importante en la hidrólisis de paredes celulares del fitopatógeno (5, 26).

El tiempo en el que se alcanza la máxima actividad enzimática depende del medio empleado y del aislamiento estudiado. Las enzimas líticas producidas por *Trichoderma* spp. son las responsables de la inhibición *in vitro*, y pueden contribuir al control de fitopatógenos cuando se aplican estos inoculantes microbianos en invernadero y campo (15).

CONCLUSIONES

T. asperellum Ta13-17 tuvo capacidad de biocontrol al inhibir el crecimiento micelial en, al menos, 60 % en tres de los cinco fitopatógenos evaluados; en todos presentó micoparasitismo.

El filtrado libre de células de *T. asperellum* Ta13-17 inhibió la esporulación y la germinación de conidios en tres de los cinco hongos fitopatógenos aislados de tomate.

A partir del tercer día después de la siembra *T. asperellum* Ta13-17, mostró actividad enzimática independiente del inductor utilizado.

REFERENCIAS

1. Cardozo VF, Kupper KC, Rosa MM, Gomes TM, Rossi F. *Trichoderma* spp. isolates with potential of phosphate solubilization and growth promotion in cherry tomato. *Pesqui Agropecu Trop*. 2017;47(4): 360-368.
2. Latz MAC, Birgit J, Collinge DB, Hans JJJ. Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecol Divers*. 2018; DOI: [10.1080/17550874.2018.1534146](https://doi.org/10.1080/17550874.2018.1534146).
3. Pineda IJA, Benavides SEN, Duarte TAS, Burgos RCA, Soto ACP, Pineda SCA, *et al.* Producción de biopreparados de *Trichoderma* spp: una revisión. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 2017;51(1):47-52.
4. Cruz TA, Rivero GD, Martínez CB, Echevarría HA, Rodríguez AT. Evaluación de la actividad antifúngica de *Trichoderma asperellum* Samuels ante patógenos fúngicos que afectan al cultivo de la soya (*Glycine max* L.). *Cultivos Tropicales*. 2017;38(4): 15-21.
5. Naglot A, Goswami S, Rahman I, Shrimali DD, Yadav KK, Gupta VK, *et al.* Antagonistic Potential of Native *Trichoderma viride* Strain against Potent Tea Fungal Pathogens in North East India. *Plant Pathol J*. 2015;(31):278-289.
6. Zeilinger S, Gruber S, Bansal R, Mukherjee KP. Secondary metabolism in *Trichoderma*-Chemistry meets genomics. *Fungal Biology*. 2016;(30):74-90.
7. Schickler H, Chet I. Heterologous chitinase gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 1997;(19):196-201.
8. Macías de la CG, Veán F, Contreras EJC, Aguilar CN, Rodríguez HR. Cinética de crecimiento de *Fusarium oxysporum* cultivado en diferentes niveles de glucosa y pectina. *Investig Cienc*. 2016; 24(67):33-37.
9. Bunbury BAL, Walker AK. *Trichoderma* species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against *Fusarium* basal rot of onion. *Biological Control*2018; <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.11.007>
10. Samaniego J, Ulloa A, Herrera T. Hongos del suelo antagonicos de *Phymatorichum omnivorum*. *Rev Mex Fitopatol*. 1989;7(1):86-95.
11. Bell DK, Wells HD, Markham CR. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathol Res*. 1982; (72):379-382.
12. Ochoa MA, Rivas V, Góngora C, Tovar S, Cristóbal J, Loeza K, *et al.* Sistemas computarizados en epidemiología: 2-Log ver. 1.0 y su aplicación en el diseño de escalas diagramáticas logarítmicas. *XXIX Simposio Nacional de Parasitología Agrícola*. 2000. Puerto Vallarta, México.
13. Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R, Ochoa-Moreno ME. Producción y efecto antagonico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* *in vitro*. *Rev Chapingo Ser Hortic*. 2005;11(2): 273-278.
14. Romero CT, López PP, Ramírez LM, Cuervo PJ. Modelado cinético del micoparasitismo por *Trichoderma harzianum* contra *Cladosporium cladosporioides* aislado de frutos de cacao (*Theobroma cacao*). *Chil J Agric Anim Sci*. 2015; 31(3):32-45.
15. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem*. 1959; 31(3):426-428.
16. Ayoubi N, Zafari D, Mirabolfathy M. Evaluation of β -1,3-glucanase and β -1,4-glucanase enzymes production in some *Trichoderma* species. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz*. 2014;47(16):1929-1941.
17. Ramírez OJ, Trujillo SJ, Osorio EV, Jaramillo CM, Botero BL. *In vitro* antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, and *Fusarium oxysporum*. *Rev. UIS Ingenierías*. 2019; 18(2):159-165 DOI: [10.18273/revuin.v18n2-2019015](https://doi.org/10.18273/revuin.v18n2-2019015).
18. Rahman KM, Haque Z, Rasool F, Salati K, Khan U, Mohiddin FA, *et al.* Management of root-rot disease complex of mungbean caused by *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* through soil application of *Trichoderma* spp. *Crop Prot*. 2019; doi: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.01.014>.
19. Sánchez- GBM, Espinosa HE, Villordo PE, Rodríguez GR, Mora AMA. Identificación molecular y evaluación antagonica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos de raíz en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Montcalm. *Agrociencia*. 2017;(51): 63-79.

20. De la Cruz QR, Roussos S, Rodríguez HR, Hernández CD, Aguilar CN. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. KIJOMS. 2018;(20):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.03.002>
21. Espinoza ACA, Gallegos MG, Hernández CFD, Ochoa FYM, Cepeda SM, Castillo RF. Antagonistas microbianos a *Fusarium* spp., como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. Ecosistemas y recursos agropecuarios. 2019;6(16): 45-55. DOI: [10.19136/era.a6n16.1843](https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1843).
22. Osorio HE, Hernández CFD, Rodríguez HR, Varela FSE, Estrada DB, López SJA. Actividad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia solani* *in vitro*. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 2016; (67):5-11.
23. Vargas HHA, Gilchrist RE. Producción de enzimas hidrolíticas y actividad antagonista de *Trichoderma asperellum* sobre dos cepas de *Fusarium* aisladas de cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*). Rev Mex Micol. 2015;42: 9-16.
24. González I, Infante D, Peteira B, Martínez B, Arias Y, González N, *et al.* Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. I. Expresión de actividad quitinasa. Rev Protección Veg. 2010;25(1):58-63.
25. González I, Infante D, Peteira B, Martínez B, Arias Y, González N, *et al.* Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasa. Rev Protección Veg. 2011;26(1): 23-29.
26. Awad NE, Kassem HA, Hamed MA, El-Feky AM, Elnaggar MAA, Mahmoud K, *et al.* Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*. Mycology. 2018; 9:1, 70-80. <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1423126>

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

Contribución de los autores: **Sandy Esther Celis-Perera** participó en la ejecución de los experimentos de confrontación, actividad enzimática y redacción del manuscrito. **Felicia Amalia Moo-Koh** participó en el aislamiento e identificación de los organismos y contribuyó con la redacción del manuscrito. **Arturo Reyes-Ramírez** trabajó en el diseño y orientación de la actividad enzimática, y participó en la revisión y redacción final del manuscrito. **José María Tun Suárez** realizó una revisión crítica y aportó sus conocimientos en el proceso de redacción del manuscrito. **Jairo Cristóbal-Alejo** orientó el estudio y el diseño de la investigación. Líder del proyecto de investigación. Participó en el análisis de los resultados y en la revisión crítica del manuscrito y aprobación final.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)