

# PRODUCCIÓN Y EFECTO ANTAGÓNICO DE QUITINASAS Y GLUCANASAS POR *Trichoderma* spp, EN LA INHIBICIÓN DE *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* IN VITRO

A. C. Michel-Aceves<sup>1¶</sup>; M. A. Otero-Sánchez<sup>1</sup>; O. Rebolledo-Domínguez<sup>2</sup>;  
R. Lezama-Gutiérrez<sup>2</sup>; M. E. Ochoa-Moreno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnía, Centro de Estudios Profesionales-Colegio Superior Agropecuario del estado de Guerrero (CEP-CSAEGRO),  
Apdo. Postal 6 y 9, Iguala, Guerrero. C. P. 40000. MÉXICO.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima (FCBA-U. de C),  
Apdo. Postal 36, Carr. Colima-Manzanillo km. 40, Tecomán, Colima. C. P. 28100. MÉXICO.  
Correo-e: amichelaceves@yahoo.com.mx (¶Autor responsable)

## RESUMEN

Se cuantificó la producción de las enzimas hidrolíticas: quitinasas y glucanasas producidas por cepas de *Trichoderma* spp., así como su efecto antibiótico *in vitro* sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum*. La producción de quitinasas osciló entre 0.33 y 2.29 µmol de N-acetilglucosamina y la de glucanasas de 14.4 a 60.6 µmol de glucosa. Las quitinasas de *T. harzianum* (Thzcf-9 y Thzcf-6), inhibieron el crecimiento del micelio de *F. oxysporum* en 34 y 27 % y de *F. subglutinans* 35 y 21 %, respectivamente. El potencial reproductivo en la producción de conidios se redujo hasta un 95 y 86 %, mientras que la viabilidad de los mismos un 66 y 73 % en *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, respectivamente. Las glucanasas de *T. koningii* (Tkcf-2) y *T. harzianum* (Thzcf-6) inhibieron el crecimiento del micelio de *F. oxysporum* en 44 y 32 % y en el caso de *F. subglutinans* 38 y 34 % respectivamente. Adicionalmente se logró reducir hasta un 95 % la producción de conidios de ambas especies de *Fusarium* y un 74 y 64 % su viabilidad en *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, respectivamente. Los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio sugieren que *T. harzianum* (Thzcf-9 y Thzcf-6) por la actividad de quitinasas, así como *T. koningii* (Tkcf-2) y *T. harzianum* (Thzcf-6) por la actividad de glucanasas, tienen potencial como agentes de biocontrol sobre las dos especies de *Fusarium* involucrados en la etiología de la "escoba de bruja" del mango.

**PALABRAS CLAVE ADICIONALES:** antibiosis, *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. koningii*, *T. minutisporum*.

## PRODUCCIÓN Y EFECTO ANTAGÓNICO DE QUITINASAS Y GLUCANASAS POR *Trichoderma* spp, EN LA INHIBICIÓN DE *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* IN VITRO

## ABSTRACT

The production of the hydrolithic enzymes: chitinases and glucanases was quantified by strain of *Trichoderma* spp., as well as their antibiotic effect *in vitro* on the growth of the mycelium and reproductive potential of *Fusarium subglutinans* and *F. oxysporum*. The chitinases production oscillated between 0.33 and 2.29 µmol of N-acetylglucosamine and that of glucanases from 14.4 to 60.6 µmol of glucose. The chitinases of *T. harzianum* (Thzcf-9 and Thzcf-6), they inhibited the growth of the mycelium of *F. oxysporum* in 34 and 27% and of *F. subglutinans* 35 and 21%, respectively. The reproductive potential in the conidia production decreased until a 95 and 86%, while the viability of the same ones a 66 and 73% in *F. oxysporum* and *F. subglutinans*, respectively. The glucanases of *T. koningii* (Tkcf-2) and *T. harzianum* (Thzcf-6) they inhibited the growth of the mycelium of *F. oxysporum* in 44 and 32% and in the case of *F. subglutinans* 38 and 34% respectively. Additionally it was possible to reduce until 95% the conidia production of both species of *Fusarium* and a 74 and 64% their viability in *F. oxysporum* and *F. subglutinans*, respectively. The results obtained under laboratory conditions suggest that *T. harzianum* (Thzcf-9 and Thzcf-6) for the chitinases activity, as well as *T. koningii* (Tkcf-2) and *T. harzianum* (Thzcf-6) for the glucanases activity, they have potential as biocontrol agents on the two species of *Fusarium* involved in the etiology of the mango malformation.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** antibiosis, *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. koningii*, *T. minutisporum*.

## INTRODUCCIÓN

La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas líticas (Baker y Griffin, 1995) las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y  $\beta$ -1-3-glucanos, de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Goldman *et al.*, 1994). Entre mayor sea la cantidad de productos metabólicos, el poder antagonístico se incrementa (Pezet *et al.*, 1999).

La habilidad de *Trichoderma* spp. para reducir los daños causados por hongos fitopatógenos, está relacionada con su capacidad de competencia (Nelson *et al.*, 1988), de antibiosis por la producción de enzimas líticas y otros metabolitos secundarios (Ghrisalbetti y Sivacithamparam, 1991), así como al micoparasitismo (Henis *et al.*, 1983). Muchas especies de este género son agentes de control biológico con potencial contra un gran número de enfermedades (Jakobs *et al.*, 1991). En particular, *Trichoderma harzianum* Rifai, es la especie con más amplio espectro de control, bajo diferentes condiciones ambientales (Migheli *et al.*, 1995). Entre las enzimas líticas que producen especies de *Trichoderma* se reportan a las quitinasas, glucanasas (Bruce *et al.*, 1995; Benhamou y Chet, 1997), proteasas y celulasas; algunas están relacionadas con el fenómeno de antibiosis y micoparasitismo al degradar la pared celular y micoparasitar al hospedero (Schickler y Chet, 1997).

Las quitinasas, glucanasas y proteasas, son las enzimas más mencionadas involucradas en el control biológico de fitopatógenos. La cantidad de metabolitos producidos por *Trichoderma* depende de los nutrientes y no siempre está relacionada con la habilidad para controlar a la enfermedad (Worasatit *et al.*, 1994); sin embargo, Madi *et al.* (1997) indicaron una correlación positiva entre la cantidad de enzimas (quitinasas, glucanasas y otras) y el porcentaje de micoparasitismo y reducción de la enfermedad. Goldman *et al.* (1994), señalaron inhibición *in vitro* de la germinación de conidios y alargamiento de la hifa en *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Fusarium gramineum* Corda [W&R,G], por enzimas quitinolíticas y glucanolíticas producidas por *T. harzianum*. Es conveniente precisar el efecto de las quitinasas y glucanasas producidas por *Trichoderma* spp., sobre otras especies de *Fusarium* que atacan partes aéreas, ya que esto permitiría formular estrategias de manejo para reducir las aspersiones de los funguicidas químicos y disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad. Con base en lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron: cuantificar la producción de quitinasas y glucanasas en diferentes cepas de *Trichoderma* spp., y evaluar su efecto antibiótico sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo *in vitro* de *F. subglutinans* y *F. oxysporum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las veinte cepas de *Trichoderma* que se utilizaron corresponden: *T. harzianum* Rifai (13), *T. longibrachiatum* Rifai (2), *T. koningii* Oudem (2), *T. minutisporum* Rifai (1), *T. (= Gliocladium) virens* (Miller, Giddens & Foster) (1) y no identificada (1). Fueron aisladas a partir de suelo obtenido en huertas de mango afectadas con la malformación de la inflorescencia o "escoba de bruja", en la zona norte del estado de Guerrero, México.

Las especies de hongos fitopatógenos, *F. subglutinans*, cepa GUE-AL002, y *F. oxysporum*, cepa GUE-AL001, agentes causales de "escoba de bruja" fueron proporcionadas por el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, mismas que se aislaron de plantas de mango.

Se utilizó un medio de cultivo líquido para la producción de la quitinasas y glucanasas por cada una de las cepas evaluadas, según la metodología propuesta por Harman *et al.* (1993) y Worasatit *et al.* (1994). En matraces Erlenmeyer de 250 ml se colocaron 50 ml de medio de cultivo formado por 10 g de  $\text{KNO}_3$ ; 5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2 mg de  $\text{FeCl}_3$ ; 150 ml de jugo V8; 10 g de polivinilpirrolidona (Sigma, St. Louis, MO) y 1000 ml de agua desionizada. El medio se adicionó con 1 % (p:v) de quitina en hojuelas (Sigma) para inducir la producción de quitinasas y con 0.1 % (p:v) de laminarina para la inducción de las glucanasas. El pH del medio se ajustó a 6.0 y se esterilizó a 121 °C por 20 min. Posteriormente se inoculó con 1 ml de una suspensión de conidios con una concentración final de  $1 \times 10^6$  conidios por ml para luego incubar a 25 °C, 12 h luz/oscuridad y 40 % de humedad relativa en un agitador rotatorio a 180 rpm durante 5 días para quitinasas y 8 días para glucanasas. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo que contenía las enzimas de interés se separó de la biomasa por filtración con papel filtro Whatman No. 1; posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min, las partículas residuales que aún permanecieron en el sobrenadante se separaron por filtración a través de fibra de vidrio (Hadar *et al.*, 1979) e inmediatamente después, la mitad del filtrado se utilizó para las pruebas de inhibición y la otra mitad para determinar la cantidad de quitinasas y glucanasas mediante las metodologías de Bruce *et al.* (1995), Nelson (1944), Somogyi (1952) y Reissing *et al.* (1955) con base en la cantidad de proteína total producida. Las variables utilizadas para cuantificar la presencia de las enzimas fueron: la actividad total y la actividad específica; en quitinasas expresada como mmoles de N-acetilglucosamina mg de proteína por hora y para el caso de glucanasas expresada como mmoles de glucosa por mg de proteína por hora. En total se formaron 20 tratamientos, que corresponden a las diferentes cepas de *Trichoderma* spp., 10 para quitinasas y 10 para glucanasas, distribuidos bajo el diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el programa de cómputo estadístico SAS (SAS, 1988).

El filtrado obtenido de los medios de cultivo con la enzima (quitinasa o glucanasa, según el caso) se esterilizó utilizando filtro millipore 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Co., Bedford, MA) y 10 ml del filtrado estéril de cada uno de los tratamientos, se mezcló en proporción 1:1 (v:v) en PDA (5.9 %) antes de solidificar. Cada caja petri se inoculó con un disco de 5 mm de diámetro de PDA (3.9 %) con micelio de colonias de 10 días en crecimiento activo de cada una de las especies de *Fusarium* spp. y se incubaron a 25 °C, 12 horas luz/oscuridad y 40 % de humedad relativa por 12 días. Se utilizaron como testigo, cajas petri con PDA más agua destilada estéril en lugar de filtrado (Madi *et al.*, 1997). El diámetro de las colonias, expresado en milímetros, se registró cada dos días hasta 12 días después de la inoculación, tiempo en el cual el testigo llenó la superficie de la caja Petri. Los datos se expresaron en porcentaje de inhibición. El número de conidios producidos por las especies de *Fusarium* en cada tratamiento se determinó en la cámara hematómetra de Neubauer (Lumycite, Propper, Manufacturing Co. Inc. Long Islan, NY) 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; se contabilizaron los conidios, expresándose los resultados en número de conidios por caja. Para cuantificar el porcentaje de germinación de las unidades formadoras de colonias (ufc) se sembraron 100 conidios en cajas petri de 9.0 cm de diámetro que contenía medio de cultivo papa dextrosa agar, contabilizando el número de ufc de germinadas a las 48 h posteriores a la siembra. El efecto antibiótico de las quitinasas en el porcentaje de inhibición del micelio, número de conidios y porcentaje de germinación de ufc de *F. subglutinans* y *F. oxysporum* se realizó con los 10 tratamientos que corresponden a las cepas de *Trichoderma* spp. en cada una de las especies de *Fusarium* spp. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. A los datos en porcentaje, antes de someterlos al análisis de varianza y prueba de diferenciación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el programa de cómputo estadístico SAS (SAS, 1988) se les realizó la transformación angular ( $\sqrt{\% \text{ arco seno}}$ ). También se realizó un análisis de correlación entre las variables.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas de *Trichoderma* spp. fueron capaces de producir quitinasas y glucanasas. Los resultados obtenidos coinciden con los encontrados con Hadar *et al.* (1979) y Bruce *et al.* (1995), con cantidades muy heterogéneas, aún en cepas de la misma especie.

En la producción de ambas enzimas, el análisis de varianza detectó diferencias ( $P \leq 0.01$ ). La cantidad de

quitinasas (N-Acetil-D-glucosamina) varió de 0.33 a 2.29  $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  de proteína (Cuadro 1), y la de glucanasas (glucosa) varió entre 14.4 y 60.6  $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  de proteína (Cuadro 2). En quitinasas, la mayor producción la presentó *T. harzianum* (Thzcf-9) con 2.29  $\mu\text{mol}$ , seguida en orden decreciente por las cepas Thzcf-6 y Thzcf-2, con 1.21 y 1.01  $\mu\text{mol}$ , respectivamente, también de la especie *T. harzianum*. El resto de las cepas se encuentran en los demás niveles. La cepa Thzcf-8 produjo menor cantidad de enzima, con 0.33  $\mu\text{mol}$  (Cuadro 1). Los niveles producidos de quitinasas en la presente investigación fueron superiores a las indicadas por Bruce *et al.* (1995) con valores máximos de 0.72 mmol; sin embargo, inferiores a las reportadas por Elad *et al.* (1983), con 4.4 mmol y Madi *et al.* (1997) con 15.0 mmol. En glucanasas, *T. koningii* (Tkcf-2) obtuvo la mayor producción, con 60.613  $\mu\text{mol}$  glucosa, estadísticamente diferente al resto de las cepas; le siguieron en el segundo nivel, *T. harzianum* (Thzcf-6) y *T. longibrachiatum* (TI-15) con 22.9 y 22.2  $\mu\text{mol}$ . *T. harzianum* (Thzcf-7), presentó la menor actividad específica, con 14.4  $\mu\text{mol}$  (Cuadro 2). Los valores obtenidos son superiores a los indicados por Soler *et al.* (1999), Bruce *et al.* (1995) y Elad *et al.* (1983), con cantidades máximos de 6.6, 5.3 y 4.4 mmol de glucosa, respectivamente.

No obstante de existir datos donde la producción de enzimas y otros metabolitos por cepas de *Trichoderma* es muy variable y no está relacionada con la habilidad para controlar enfermedades (Worasatit *et al.*, 1994), a mayores cantidades del antagonico adicionado al suelo, reduce los daños por *R. solani* bajo condiciones de invernadero (Hadar *et al.*, 1979). Asimismo, Lorito *et al.* (1994), indican que a mayor concentración enzimática se reduce la germinación de esporas de *B. cinerea*, mas aún si existe sinergismo positivo de actividad quitinolítica y glucanolítica. También con otros agentes de control, como es *Talaromyces flavus*,

**CUADRO 1. Producción de quitinasas por cepas de *Trichoderma* spp.**

Cepa	Especie	Actividad Total (N-Acetyl gluco- samina $\mu\text{mol}$ )	Actividad Específica (N-Acetyl glucosamina en $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ de proteína)
Thzcf-9	<i>T. harzianum</i>	0.0385 a <sup>z</sup>	2.29 a
Thzcf-6	<i>T. harzianum</i>	0.0129 b	1.21 b
Thzcf-2	<i>T. harzianum</i>	0.0047 c	1.01 c
Thzcf-7	<i>T. harzianum</i>	0.0054 c	0.82 d
Thzcf-4	<i>T. harzianum</i>	0.0058 c	0.75 e
Thz-7	<i>T. harzianum</i>	0.0048 c	0.49 f
T-405	<i>T. sp.</i>	0.0056 c	0.44 g
Tkcf-1	<i>T. koningii</i>	0.0060 c	0.44 g
Thzcf-1	<i>T. harzianum</i>	0.0050 c	0.43 g
Thzcf-8	<i>T. harzianu</i>	0.0061 c	0.33 h

<sup>z</sup>Valores dentro de columnas seguidas con la misma letra son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .

**CUADRO 2. Producción de glucanasas por cepas de *Trichoderma* spp.**

Cepa	Especie	Actividad Total ( $\mu\text{mol glucosa}$ )	Actividad Específica (glucosa en $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ de Proteína )
Tkcf-2	<i>T. koningii</i>	1747.2 a <sup>z</sup>	60.6 a
Thzcf-6	<i>T. harzianum</i>	1493.2 b	22.9 b
TI-15	<i>T. longibrachiatum</i>	1400.2 b	22.2 bc
TI-16	<i>T. longibrachiatum</i>	1227.7 c	19.4 cd
Tvs-1	<i>T. virens</i>	1045.0 de	18.5 cd
Tmcf-1	<i>T. minutisporum</i>	920.2 g	17.2 de
Thz-6	<i>T. harzianum</i>	944.2 f	17.2 de
Thz-9	<i>T. harzianum</i>	1178.0 d	17.1 de
Thzcf-1	<i>T. harzianum</i>	965.2 f	15.3 def
Thzcf-7	<i>T. harzianum</i>	1232.6 c	14.4 ef

a mayor producción de quitinasas, glucanasas, celulasas y glucosa oxydasa, es mayor el porcentaje de micoparasitismo *in vitro* sobre *S. rolfisii*, además de presentar correlación positiva ( $r = 0.895$ ;  $P \leq 0.05$ ) con el contenido de quitinasas y el micoparasitismo (Madi *et al.*, 1997).

Se observó que existe efecto de antibiosis por actividad de las quitinasas y glucanasas, todas las cepas en diferentes grados lograron inhibir el crecimiento del micelio de *F. subglutinans* y sólo algunas a *F. oxysporum*. A mayor concentración el efecto sobre los fitopatógenos se hace evidente; sin embargo, no todas las cepas de *Trichoderma* lograron manifestarlo en gran magnitud.

Existió diferencias ( $P \leq 0.01$ ) entre cepas para ambas enzimas; en quitinasas, los valores oscilaron entre 0.0 a

33.8% (Cuadro 3). *T. harzianum* (Thzcf-9, Thzcf-6 y Thzcf-2) produjeron la mayor cantidad de esta enzima y son las que presentaron efecto antagónico sobre el PDA. Con cantidades superiores a 1.0 mmol de N-Acetyl-glucosamina se inhibió del 19 al 33 % y del 20 al 35 % el crecimiento del micelio de *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, respectivamente. Para glucanasas, *T. koningii* (Tkcf-2) y *T. harzianum* (Thzcf-6) que lograron las producciones más altas y manifestaron mayor efecto de inhibición en PDA; a concentraciones superiores a los 22.8 mmol de glucosa inhibieron entre el 27 y 34 % y del 20 al 35 % el crecimiento del micelio de *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, respectivamente (Cuadro 4).

Se hace evidente que *F. subglutinans* es más susceptible a la acción de ambas enzimas; lo anterior puede deberse a que la pared celular de *F. oxysporum* tiene una capa externa de glicoproteínas que cubre a la interna compuesta de quitina y glucanos, de tal manera que resiste más a la actividad de quitinasas y glucanasas y se requiere mayor concentración de enzimas para degradarla (Schoffemeer *et al.*, 1999); para el caso de *F. subglutinans* no existen evidencias de dicha capa.

También existe un efecto ( $P \leq 0.01$ ) de antibiosis sobre el potencial reproductivo por ambas enzimas; las quitinasas lograron reducir la formación de conidios en *F. oxysporum* de  $8.85 \times 10^7$  a  $0.49 \times 10^7$  conidios, que representa el 94.5 % de reducción del potencial reproductivo, en tanto que para *F. subglutinans* se redujo de  $4.15 \times 10^7$  a  $0.58 \times 10^7$  conidios; es decir, una disminución del 86.0 %. Efecto similar en la viabilidad de los conidios, al disminuir la germinación 66.3 y 73.0 % (Cuadro 3). En las glucanasas se observó un efecto similar al reducir drásticamente la formación de conidios, hasta en un 93.6 % en *F. oxysporum* y un 84.9 % en *F. subglutinans*. Más aún, la viabilidad de dichos conidios se redujo de un 74.2 y 63.6 % para ambas

**CUADRO 3. Efecto antagónico de las quitinasas de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de *F. subglutinans* (Fs) y *F. Oxysporum* (Fo).**

Cepa	Especie	Inhibición micelio (%)		No. conidios $\times 10^7$ por caja		Germinación ufc (%)	
		Fs	Fo	Fs	Fo	Fs	Fo
Thzcf-9	<i>T. harzianum</i>	35.4 a <sup>z</sup>	33.8 a	0.41 h	1.38 f	30.3 e	56.3 ef
Thzcf-6	<i>T. harzianum</i>	20.6 b	27.2 a	0.58 fg	0.49 i	26.1 e	22.1 i
Thzcf-1	<i>T. harzianum</i>	20.6 b	4.2 c	0.73 ef	5.31 a	62.0 cd	78.1 b
Thz-7	<i>T. harzianum</i>	13.5 bc	0.0 d	0.89 de	3.16 c	62.8 cd	36.1 h
Thzcf-4	<i>T. harzianum</i>	10.1 cd	0.0 d	0.64 fg	3.07 d	59.8 c	56.7 ef
Tkcf-1	<i>T. koningii</i>	9.2 de	0.0 d	0.35 i	0.66 i	62.2 cd	66.0 d
Thzcf-2	<i>T. harzianum</i>	8.5 de	19.3 b	0.90 cd	3.73 b	70.6 bc	64.9 d
T-405	<i>T. sp.</i>	2.9 f	0.0 d	1.06 bc	2.99 cd	61.8 cd	75.7 bc
Thzcf-7	<i>T. harzianum</i>	0.0 g	0.0 d	0.39 h	1.24 gh	61.2 cd	51.0 g
Thzcf-8	<i>T. harzianum</i>	0.0 g	0.0 d	0.31 i	2.02 e	57.4 d	71.0 c
Testigo		0.0 g	0.0 d	4.15 a	8.85 a	96.7 a	98.3 a

<sup>z</sup>Valores dentro de columnas seguidos con la misma letra son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05$ .



especies (Cuadro 4) De esta forma, el inóculo secundario que se forma es muy escaso, quedando de manifiesto la actividad antibiótica de las enzimas.

Lorito *et al.* (1993), indicaron que la actividad quitinolítica y glucanolítica de *T. harzianum* parecen estar biológicamente más activas y efectivas que otras enzimas de otras fuentes, contra un amplio rango de hongos, inhiben totalmente la germinación de esporas de varios hongos fitopatógenos, entre ellos, *B. cinerea*, *F. solani*, *F. graminearum*, y *P. ultimum*, a concentraciones de 200-300 mg·ml<sup>-1</sup> (Punja y Zhang, 1993). En general, los resultados obtenidos concuerdan con lo mencionado por Siwek *et al.* (1997), en el sentido de que las enzimas líticas producidas por *Trichoderma* spp., son las responsables de la inhibición *in vitro* y pueden contribuir al control de fitopatógenos a nivel invernadero y campo.

### CONCLUSIONES

Las cepas *T. harzianum* (Thzcf-9 y T.hzcf-6) por la producción de quitinasas y *T. koningii* (Tkcf-2) y *T. harzianum* (Thzcf-6) por la producción de glucanasas, tienen efecto antagónico sobre ambas especies de *Fusarium* en condiciones de laboratorio, y son candidatos potenciales para utilizarse en el control, bajo condiciones de invernadero y campo de estos fitopatógenos.

### LITERATURA CITADA

BAKER, R.; GRIFFIN, G., J. 1995. Novel approaches to Integrated pest management, pp. 153-182. In: Molecular Strategies for Biological Control of Fungal Plant Pathogens. Reuveni, R. (ed.). CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA.

- BENHAMOU, N.; CHET, I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. App. Environ. Microbiol. 63: 2095-2099.
- BRUCE, A.; SRINIVASAN, U.; STAINES, H., J.; HIGHLEY, T. L. 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.
- ELAD, Y.; HADAR, Y.; CHET, I. 1983. The potential of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent under field condition. Les Colloques de L'INRA 18: 305-310.
- GHRISALBERTI, E. L.; SIVACITHAMPARAM, K. 1991. Antifungal antibiotic produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. & Biochem. 23: 1011-1020.
- GOLDMAN, G. H.; HAYES, C.; HARMAN, G. E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Biotech. Tibtech. 12: 478-482.
- HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69: 64-68.
- HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology 83: 313-318.
- HENIS, Y.; ADAMS, P. B.; LEWIS, J. A.; PAPAIVAS, G. C. 1983. Penetration of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. Phytopathology 73: 1043-1046.
- JAKOBS, D.; GEREMIA, R. A.; GOLDMAN, G. H.; KAOMEN, O.; VAN MONTAGY, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. 1991. Study of the expression of b-(1-3) glucanase of *Trichoderma harzianum*. Petria 1: 125-126.
- LORITO, M.; HAYES, C. K.; DI PIETRO, A.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E. 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-b-glucosidase and N-acetyl-b-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 84: 398-405.

**CUADRO 4. Efecto antagónico de las glucanasas de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de *F. subglutinans* y *F. oxysporum*.**

Cepa	Especie	Inhibición micelio (%)		No. conidios x 10 <sup>7</sup> por caja		Germinación ufc (%)	
		Fs	Fo	Fs	Fo	Fs	Fo
Tkcf-2	<i>T. koningii</i>	38.4 A <sup>z</sup>	43.7 a	0.65 h	0.58 f	34.8 g	25.2 i
Thzcf-6	<i>T. harzianum</i>	34.2 a	32.4 a	1.95 d	2.79 c	45.0 f	46.3 fg
TI-15	<i>T. longibrachiatum</i>	32.9 a	15.9 b	1.05 g	2.78 c	45.6 f	49.7 fg
Thzcf-7	<i>T. harzianum</i>	18.1 b	0.0 d	0.68 h	2.30 c	65.7 cde	55.1 e
Thz-9	<i>T. harzianum</i>	15.6 b	0.0 d	0.68 h	2.05 cd	79.8 bc	66.5 cd
Tvs-1	<i>T. virens</i>	15.6 b	0.0 d	3.05 b	0.99 f	55.6 de	32.6 h
Thzcf-1	<i>T. harzianum</i>	6.3 c	6.1 c	1.41 e	2.24 c	56.0 de	68.7 cd
Thz-6	<i>T. harzianum</i>	5.4 de	4.2 c	2.84 c	1.98 d	50.7 e	70.4 cd
Tmcf-1	<i>T. minutisporum</i>	5.1 e	0.0 d	3.47 a	4.15 b	80.4 b	61.4 de
TI-16	<i>T. longibrachiatum</i>	0.4 f	0.0 d	0.84 f	1.62 de	56.1 de	78.6 bc
Testigo		0.0 f	0.0 d	4.32 a	9.12 a	95.7 a	97.8 a

<sup>z</sup>Valores dentro de columnas seguidos con la misma letra son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una P≤0.05.

- MADI, L.; KATAN, T.; KATAN, J.; HENIS, Y. 1997. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology* 87: 1054-1060.
- MIGHELI, Q.; WHIPPS, J. M.; BUDGE, S. P.; LYNCH, J. M. 1995. Production of inter- and intra-strain hybrids of *Trichoderma* spp. by protoplast fusion and evaluation of their biocontrol activity against soil-borne and foliar pathogens. *J. Phytopathol.* 143: 91-97.
- NELSON, E. B.; HARMAN, G. E.; NASH, G. T. 1988. Enhancement of *Trichoderma*-induced biological control of *Pythium* seed rot and pre-emergence damping-off of peas. *Soil Biol. & Biochem.* 20: 145-150.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
- PEZET, R.; PONT, V.; TABACCHI, R. 1999. Simple analysis of 6-pentyl-alpha-pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytoch. Anal.* 10: 285-288.
- PUNJA, Z. K.; ZHANG, Y. 1993. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J. Nematology* 25: 526-540.
- REISSING, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. 1955. A modified colorimetric method for estimation of N-acetylamine sugars. *Biol. Chem.* 27: 959-966.
- SAS. 1988. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03 SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 1028 p.
- SCHICKLER, H.; CHET, I. 1997. Heterologous chitinase gene expression to improve plant defense against phytopathogenic fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19: 196-201.
- SCHOFFELMEER, E. A. M.; KLIS, F. M.; CORNELISSEN, B. J.C. 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Gen. Biol.* 27: 275-282.
- SIWEK, K.; SCOTT, E. S.; HARRIS, A. R. 1997. Role of antibiosis in biological control of *Pythium ultimum* by binucleate *Rhizoctonia*. *Australasian Plant Pathology Society. Eleventh Biennial Conference. Abstract.* p. 252.
- SOLER, A.; DE LA CRUZ, J.; LLOBELL, A. 1999. Detection of b-1,6-glucanase isozymes from *Trichoderma* strains in sodium dodecyl sulphate—polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *J. Microbiol. Methods.* 35: 245-251.
- SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- WORASATIT, N.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; ROWLAND, C. 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.