

Antagonismo *in vitro*, actividad ligninolítica y de hidrolasas de pared celular en la interacción de especies de *Trichoderma* spp. con *Curvularia eragrostidis* aislado de piña

In vitro antagonism, ligninolytic and cell wall hydrolase activities in the interaction *Trichoderma* spp. - *Curvularia eragrostidis* isolated from pineapple

Sophia Jocelyne Iglesias-Velasco¹, Wilberth Chan-Cupul¹, Juan Alberto Osuna-Castro¹,
Herminia Alejandra Hernández-Ortega¹, Sara Centeno-Leija²

¹ Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima. Km. 40 Autopista Colima-Manzanillo, Tecmán, C.P. 28930, Colima, México.

² Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Laboratorio de Biología Sintética, Estructural y Molecular, Laboratorio de Agrobiotecnología, Universidad de Colima. Carretera Los Limones-Loma de Juárez, C.P. 28627 Colima, Colima, México.

RESUMEN

Antecedentes: *Curvularia eragrostidis* es el agente causal de la mancha foliar en piña. La búsqueda de agentes de control biológico contra *C. eragrostidis* es una actividad de interés agrícola.

Objetivo: Evaluar la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *C. eragrostidis* y determinar la presencia de H₂O₂, lacasa, quitinasa y β-glucanasa.

Métodos: Se confrontaron una cepa de *C. eragrostidis* y seis cepas de *Trichoderma* spp. (T-82, T-84, T-85, T-94, T-98, T-99). Se determinaron los tipos de interacción. Espectrofotométricamente se determinó la actividad lacasa, H₂O₂ y proteína total en el extracto enzimático de la confrontación. Se cuantificó cualitativamente la actividad quitinasa y β-glucanasa de *C. eragrostidis* y de *Trichoderma* sp. T-98.

Resultados y conclusiones: *Trichoderma* sp. T-98 inhibió a *C. eragrostidis* en un 61 % con un tipo de interacción "reemplazo parcial después de una inhibición a distancia". *C. eragrostidis* produjo lacasa (0.027 U/mg de proteína) y H₂O₂ (0.33 mg/L), los cuales incrementaron cuando se confrontó con *Trichoderma* sp. T-94 (Lacasa=0.219 U/mg de proteína) y *Trichoderma* sp. T-98 (H₂O₂=6.47 mg/L), respectivamente. *Trichoderma* sp. T-98 produjo quitinasas y β-glucanasa, mientras que *C. eragrostidis* solo produjo quitinasas. El incremento de H₂O₂ y lacasa se asocia a la defensa de *C. eragrostidis* contra *Trichoderma* spp.

Palabras clave: *Ananas comosus*, confrontación, lacasa, mancha foliar

ABSTRACT

Background: *Curvularia eragrostidis* is the causal agent of pineapple leaf spot disease. The search for biological control agents against *C. eragrostidis* is an activity of agricultural interest.

Objective: To evaluate the antagonistic capacity of *Trichoderma* spp. on *C. eragrostidis* and to determine the H₂O₂, laccase, chitinase and β-glucanase activities.

Methods: A strain of *C. eragrostidis* and six strains of *Trichoderma* spp. (T-82, T-84, T-85, T-94, T-98, T-99) were co-cultured. Interaction types were determined. Laccase activity, H₂O₂ and total protein in an enzymatic extract from the confrontation were determined spectrophotometrically. Qualitative chitinase and β-glucanase activities in *C. eragrostidis* and *Trichoderma* sp. T-98 were measured.

Results and conclusions: *Trichoderma* sp. T-98 inhibited *C. eragrostidis* by 61.0 % with a "partial replacement after a distant inhibition" type of interaction. *C. eragrostidis* produced laccase (0.027 U/mg of protein) and H₂O₂ (0.33 mg/L), which increased when it was confronted with *Trichoderma* sp. T-94 (Laccase=0.219 U/mg of protein) and *Trichoderma* sp. T-98 (H₂O₂=6.47 mg/L), respectively. *Trichoderma* sp. T-98 produced chitinases and β-glucanase, while *C. eragrostidis* only produced chitinases. The increase in H₂O₂ and laccase is associated with the defense of *C. eragrostidis* against *Trichoderma* spp.

Keywords: *Ananas comosus*, confrontation, laccase, leaf spot disease

ARTICLE HISTORY

Received 07/July/2022 / Accepted 28/December/2022
On line 30 December 2022

CORRESPONDING AUTHOR

✉ Wilberth Chan-Cupul, e-mail: wchan@uclm.mx
Orcid: 0000-0001-8634-3618

INTRODUCCIÓN

La Mancha Foliar (MF) de la piña (*Ananas comosus* L.) causada por *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Mey, es una enfermedad fúngica, común en diversos países productores como México (García-Ordaz *et al.* 2021). El desarrollo de infecciones causadas por especies de *Curvularia* en piña, incluyen lesiones irregulares rodeadas de halos amarillos, cloróticos o necróticos, visibles en las hojas (Ferreira *et al.* 2014, Zhong *et al.* 2016). Algunos estudios revelan que especies de *Curvularia* excretan moléculas orgánicas capaces de generar daño necrótico en diferentes órganos de las plantas (Liu *et al.* 2009).

Para el manejo integrado de la MF, algunos esfuerzos en la búsqueda de compuestos con actividad biológica contra *C. eragrostidis* se han basado en el estudio de extractos vegetales de *Swietenia humilis* Zucc., como control biorracional (Maldonado-Michel *et al.* 2021). Por otro lado, para el control cultural, se ha implementado la labranza del suelo, uso de láminas de riego adecuadas, desinfección de herramientas y uso de acolchados plásticos (Rebolledo-Martínez *et al.* 2005). Sin embargo, el empleo de agentes químicos sintéticos tales como tebuconazol, propiconazol, carbendazim y metalaxil, han sido la principal estrategia de control (Bahekar *et al.* 2017, García-Ordaz *et al.* 2021).

La búsqueda de agentes de control biológico microbiano (MBCAs por sus siglas en inglés) nativos y adaptados a las regiones locales de producción, es una actividad que puede ayudar a reducir el uso de fungicidas sintéticos y tóxicos en la producción de frutales (Köhl *et al.* 2019). El uso de MBCAs se ha intentado para combatir enfermedades fungosas en piña, como es el caso de las especies de *Trichoderma*, que ha demostrado actividad antagonista *in vitro* sobre *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium subglutinans* (Hernández-Mansilla *et al.* 2006, Sabando-Ávila *et al.* 2017). El género *Trichoderma* Pers., es considerado un MBCA por excelencia, que actúa contra hongos fitopatógenos a través de micoparasitismo y competencia por nutrientes y espacio, produciendo una amplia gama de metabolitos especializados, tales como antibióticos y moléculas que inactivan enzimas del patógeno y que son capaces de detener los procesos infecciosos (Martínez *et al.* 2013). Asimismo, *Trichoderma* posee gran cantidad de enzimas hidrolíticas como quitinasas y β -glucanasas, ampliamente estudiadas por su capacidad para

degradar polímeros que constituyen la pared celular de la mayoría de los hongos fitopatógenos (Di Cologna *et al.* 2017, Bae *et al.* 2017). Adicionalmente, se ha demostrado que, durante cultivos antagónicos, *Trichoderma* tiene la capacidad de producir *in situ* peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es un oxidante y un precursor de radicales libres, que participa en los procesos de oxidación avanzada (Chan-Cupul *et al.* 2016). El género *Trichoderma* se comporta como saprófito, endófito y patógeno de otros hongos, incluyendo a especies de *Curvularia* (Ramírez-Olier *et al.* 2019), por lo que resulta un antagonista natural candidato para el desarrollo de productos biológicos para tratar casos de MF causada por *C. eragrostidis*. Sin embargo, no se han reportado especies de *Trichoderma* nativas que hayan sido estudiadas para el manejo de *C. eragrostidis* causante de la MF en la producción de piña en México.

En este trabajo, probamos la capacidad antagonista de diversas cepas nativas de *Trichoderma* sobre una cepa de *C. eragrostidis* aislada del cultivo de piña afectado con MF en el estado de Colima, junto a la capacidad antagonista, se estudió el efecto de la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y actividad enzimática ligninolítica (lacasa) e hidrolítica (quitinasa y β -glucanasa) para profundizar en la interacción de ambas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del fitopatógeno

Se realizaron visitas de campo en plantaciones de *Ananas comosus* (var. "MD2") en el rancho "El Milagro" ubicado en la localidad de Cerrito de Aguilar, municipio de Tecomán, Colima (18°47'41" N y 103°51'26.9" O) y se colectaron plantas con síntomas de la MF. Para el aislamiento, el tejido vegetal se lavó y desinfectó con hipoclorito de sodio (1 %) durante 10 min y se enjuagó con agua destilada estéril. El tejido seco y desinfectado se separó en hojas verdes y secas, posteriormente las hojas verdes se colocaron en un mortero y se les adicionó nitrógeno líquido y se trituraron, hasta obtener un polvo fino (Doyle, 1991). El proceso se repitió con las hojas secas y todas las muestras obtenidas se liofilizaron. Se colocó 0.1 g de muestra liofilizada en matraces con 120 mL de medio de cultivo Czapek, las muestras se incubaron a 27 ± 2 °C a 150 rpm, durante 48 h en una incubadora (LabTech, E.U.A.). Con el caldo de cultivo se realizó un estriado en cajas de Petri con agar dextrosa papa (PDA, MCD Lab, Tlalnequantepec, Edo.

de México), las cajas de Petri se incubaron a 30 ± 2 °C (temperatura ambiente). Siete días después, una vez que los micelios esporularon, se realizó una purificación a través de resiembras en cajas de Petri con PDA en condiciones de laboratorio en cámara de incubación (25.0 ± 3.0 , 75 % de humedad relativa y 12/12 h luz/oscuridad) de acuerdo con la metodología de Maldonado-Michel et al. (2021).

Identificación morfológica, molecular y postulados de Koch de *C. eragrostidis*

La identificación morfológica y molecular del aislado de *C. eragrostidis*, así como los postulados de Koch en plantas de piña fueron reportados por Maldonado-Michel et al. (2021).

Reactivación de cepas de *Trichoderma*

Las cepas nativas de varias especies de *Trichoderma*, aisladas de suelo arenoso, en el municipio de Tecmán, Colima y resguardados en la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima, se reactivaron en cajas Petri con PDA. En total fueron reactivadas seis cepas nativas, las cajas de Petri se incubaron y mantuvieron en condiciones de laboratorio hasta su uso.

Interacciones entre *Trichoderma* spp. - *C. eragrostidis*

Las confrontaciones se realizaron a nivel macroscópico. Se tomaron discos de agar-micelio (6 mm de θ) de *C. eragrostidis* de siete días de edad (dde) y se depositaron en cajas de Petri con medio de cultivo PDA a 1 cm del borde izquierdo de la caja. Veinticuatro horas después se depositaron los discos de agar-micelio (6 mm de θ) de *Trichoderma* spp. en los lados opuestos, se utilizaron seis repeticiones por tratamiento y se incubaron a 25 ± 3 °C por seis días (Badalyan et al. 2002). El porcentaje de inhibición de crecimiento (% IC) de cada fitopatógeno se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Ecuación 1: \% IC} = [(A1 - A2) / (A1)] \times 100. \theta$$

Donde: A1= área de crecimiento del patógeno sobre el lado opuesto, evaluada en la caja Petri y A2= área de crecimiento del patógeno en enfrentamiento. Las áreas respectivas se determinaron con el software ImageJ (National Institute of Health, Maryland, E.U.A.). Además, se determinaron los tipos de interacciones interespecíficas en los cultivos duales siguiendo la metodología propuesta por Badalyan et al. (2004), que con-

sistió en una escala de valoración visual con tres tipos (A, B y C) y cuatro subtipos (C_{A1} , C_{B1} , C_{A2} y C_{B2}) para cada hongo, donde: A= bloqueo al contacto, en la cual ninguno de los microorganismos es capaz de sobrecrecer al otro después del contacto con su micelio; B= bloqueo a distancia, sin contacto entre ambos micelios; C= reemplazo, sobrecrecimiento sin bloqueo inicial; C_{A1} = reemplazo parcial después de bloqueo inicial; C_{A2} = reemplazo total después de bloqueo inicial; C_{B1} = reemplazo parcial después de bloqueo inicial a distancia; C_{B2} = reemplazo total después de bloqueo inicial a distancia. De acuerdo con Badalyan et al. (2002), cada uno de los tipos y de los subtipos de interacción tienen un valor asignado de: A = 1, B = 2, C = 3, C_{A1} = 3.5, C_{B1} = 4, C_{A2} = 4.5, C_{B2} = 5. Con los valores se calculó el índice de antagonismo (IA) para cada cepa utilizada (Badalyan et al. 2002) a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Ecuación 2: IA} = A (n \times 1) + B (n \times 2) + C (n \times 3) + C_{A1} (n \times 3.5) + C_{B1} (n \times 4) + C_{A2} (n \times 4.5) + C_{B2} (n \times 5).$$

Dónde n=número (frecuencia) de cada tipo o subtipo de interacción.

Extracto enzimático

Para la cuantificación de lacasa, H_2O_2 y proteína total, se preparó el extracto enzimático a partir de diez discos con agar-micelio (6 mm de θ) de cada una de las cajas Petri provenientes de la confrontación. En cada repetición se tomaron diez discos micelio-agar y se colocaron en un tubo Falcon (25 mL) con 10 mL de agua destilada estéril. Los tubos se dejaron en agitación en una incubadora-rotatoria (Lab-Line Instruments, Inc. Modelo: 3530, Melrose Park, E.U.A.) a 150 rpm durante 24 h, después la solución resultante fue filtrada en papel filtro (Whatman No. 1) con una bomba de vacío. Al final el filtrado resultante se utilizó para determinar el contenido de lacasa, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y proteína total (Chan-Cupul et al. 2019).

Cuantificación de lacasa

Se empleó el método descrito por Sunil et al. (2011), por medio de la oxidación de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] (Sigma-Aldrich, E.U.A.). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 1 mL, se le agregaron 700 μ L de extracto enzimático, 200 μ L de buffer acetato de sodio (0.1 M, pH 4.5) y 100 μ L de ABTS (0.05 mM). La oxidación del sustrato se monitoreó 420 nm por tres minutos en un

espectrofotómetro (Luzeren, LS6, E.U.A.), una mezcla de reacción sin ABTS fue empleada como blanco. Una unidad de actividad enzimática de lacasa fue definida como la cantidad de la lacasa que oxida 1 μmol de sustrato (ABTS) por minuto. Las actividades de lacasa fueron expresadas como unidad de actividad específica (U/mg de proteína).

Cuantificación de H_2O_2

Se determinó por el método de yoduro/yodato, según Klassen *et al.* (1994). Se mezclaron 3 mL de solución A [33 g de KI, 1 g de NaOH, 0.1 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] en 500 mL de agua destilada en 3 mL de solución B [10 g de KHP] en 500 mL de agua destilada y 3 mL de extracto enzimático. La reacción se leyó a 351 nm en un espectrofotómetro, el blanco se estableció sustituyendo el extracto enzimático con agua destilada estéril, en la mezcla de reacción. El contenido de peróxido de hidrógeno se calculó en una curva estándar con concentraciones conocidas de H_2O_2 grado analítico (30 %, Sigma-Aldrich, E.U.A.).

Proteína total

El contenido de proteína total en el extracto enzimático se realizó por el método de Bradford (1976). El reactivo de Bradford se preparó mezclando 5 mg de azul de Coomassie G-250, 2.5 mL de etanol (grado analítico), 5 mL de ácido fosfórico y 50 mL de agua destilada estéril. La mezcla de reacción consistió en 1 mL del extracto enzimático y 1 mL del reactivo de Bradford, la reacción se midió a 595 nm en espectrofotómetro. Se empleó albúmina de huevo como estándar a concentraciones conocidas en una curva estándar para determinar la concentración de proteína total en mg/mL de las muestras de estudio.

Actividad de quitinasa y β -glucanasa

La producción de quitinasa se determinó a través de un ensayo cualitativo con la cepa *Trichoderma* sp. T-98 y con *C. eragrostidis*, la cepa de *Trichoderma* para este bioensayo fue seleccionada por presentar los porcentajes de inhibición más altos contra *C. eragrostidis*. Se utilizó un medio basal sólido con la siguiente composición (por litro): 0.3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g de KH_2PO_4 , 1 g de ácido cítrico monohidratado, 18 g de agar, 200 μL de Tween 80, 4.5 g de quitina de caparazón de camarón (Sigma-Aldrich, E.U.A.) y 0.15 g de púrpura de bromocresol (Sigma-Aldrich, E.U.A.).

Una vez mezclados todos los componentes, el pH del medio se ajustó a 4.7 con ácido cítrico y después se esterilizó a 121 °C durante 18 min (1.8 psi). Se inoculó un disco de agar-micelio (6 mm de θ) de las cepas en cajas de Petri con medio basal sólido, dichas cajas se incubaron durante 3 días a 30 °C y se observó la formación de halos de color púrpura, lo cual es indicativo de actividad quitinasa (Karimi *et al.* 2017; Sharma *et al.* 2017).

Para el ensayo cualitativo de β -glucanasa, la determinación se realizó en medio de cultivo sólido siguiendo la metodología de Karimi *et al.* (2017) con ligeras modificaciones. Se utilizó medio de cultivo Czapeck agar suplementado con el 1 % de carboximetil-celulosa (CMC, Sigma-Aldrich, E.U.A.). Una vez solidificado el medio, se inoculó un disco con micelio activo de la cepa *Trichoderma* sp. T-98 y *C. eragrostidis* al centro de la caja Petri. Éstas se incubaron a 30 °C durante 3 días. La actividad enzimática sobre las cajas se observó por inmersión en colorante Yodo de Gram (2 g de KI y 1 g de yodo en 300 mL de agua destilada) durante 20 min, seguido por desteñido con 1 N de NaCl y después con 1 N de NaOH durante 15 min. La actividad glucanasa se registró como el área de aclaramiento sobre el medio de cultivo.

Análisis de datos

Los datos de actividad de lacasa, producción de H_2O_2 y proteína total, se analizaron a través de la prueba de t-Student para determinar si existe diferencia significativa entre el monocultivo de *C. eragrostidis* y su cultivo dual con seis cepas de *Trichoderma* spp. Mientras que para la discriminación entre las cepas de *Trichoderma* spp. se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$). Todos los análisis se efectuaron con StatGraphics® y Prism® para Windows®.

RESULTADOS

Identificación morfológica y molecular de *C. eragrostidis*

El hongo en PDA formó micelios lanosos con un color inicial de blanco a café oscuro, mientras que, a partir de los 8 dde continúa cambiando de grisáceo a color pardo oliváceo o negro. En su micromorfología los micelios presentan hifas septadas de color pardo, con conidióforos simples o ramificados y curvados, el tamaño de los conidios es de 8-14 \times 21-35 μm (Figu-

ra 1). La identificación molecular de la cepa concordó con *Curvularia eragrostidis* (Hennings) (J.A. Meyer) con una similitud del 99.8 % con los números de registro: MH938080.1 y LT715562.1 en la base de datos GenBank (Maldonado-Michel et al. 2021), las secuencias de la cepa de estudio se depositaron en el GenBank con número de acceso MZ510930.

Interacciones de *Trichoderma* spp. - *C. eragrostidis*

Trichoderma sp. T-98 inhibió el crecimiento de *C. eragrostidis* en 61.66 %, este valor fue significativamente mayor ($P=0.00001$) al resto de las cepas evaluadas, las cuales oscilaron entre 41.73 % (T-99) y 56.51 % (T-85) como se muestra en la Tabla 1. Las interacciones resultantes de los co-cultivos entre *Trichoderma* spp. y *C. eragrostidis* se presentan en la Tabla 2 y Figura 2. *Trichoderma* sp. T-84 presentó el mayor IA (4.5) con una interacción del tipo reemplazo completo después de una inhibición al contacto (C_{A2}). La cepa *Trichoderma* sp. T-98 presentó un IA de 4.0 con una interacción del tipo reemplazo parcial después de una inhibición a distancia (C_{B1}). Las cepas *Trichoderma* sp. T-85, T-94 y T-99 presentaron un IA de 3.5 con un reemplazo parcial después de una inhibición al contacto. Finalmente, *Trichoderma* sp. T-82 presentó un IA más bajo (1), con una inhibición al contacto (Figura 2).

Actividades enzimáticas de *C. eragrostidis* en co-cultivo con *Trichoderma* spp.

Lacasa. La actividad específica de la lacasa se vio incrementada en los co-cultivos de *C. eragrostidis* con cepas de *Trichoderma* spp. los valores oscilaron entre 0.219 y 0.076 U/mg de proteína, mientras que en monocultivo de *C. eragrostidis* se registró un valor de 0.027 U/mg de proteína. El co-cultivo con la cepa *Trichoderma* sp. T-94 obtuvo el valor más alto, resultando 7.11 veces mayor al monocultivo, pero estadísticamente igual entre las otras cepas de *Trichoderma* spp. ($F=2.59$, $P\text{-Valor}=0.0402$, Tabla 3).

Producción de peróxido de hidrógeno. Se incrementó la producción de H_2O_2 en los co-cultivos entre *C. eragrostidis* y *Trichoderma* spp. en comparación con el monocultivo de *C. eragrostidis* ($F=79.65$, $P\text{-Valor}=0.00001$, Tabla 3). El co-cultivo entre *Trichoderma* sp.-T98 y *C. eragrostidis* presentó la mayor producción de H_2O_2 con 6.47 mg/mL, a comparación del resto de las interacciones (0.74 mg/mL en *C. eragrostidis-Trichoderma* sp. T-94 y 4.8 mg/mL en *C. eragrostidis-Trichoderma* sp. T-84) y el monocultivo de *C. eragrostidis* (0.33 mg/mL).

Proteína total. La proteína total incrementó significativamente en el co-cultivo *C. eragrostidis-Trichoderma* sp. T-98 con un valor de 22.86 mg/mL, resultando mayor al monocultivo de *C. eragrostidis* (11.33 mg/L) y al resto de las interacciones, las cuales presentaron valores en un intervalo de 8.94 (*C. eragrostidis-Trichoderma* sp. T-94) a 16.21 mg/mL (*C. eragrostidis-Trichoderma* sp. T-85, Tabla 3).

Ensayo cualitativo de quitinasa. En la medición cualitativa de la actividad de quitinasa producida por las cepas T-98 y *C. eragrostidis*, se observó la formación de halos de color púrpura, lo cual es indicativo positivo de actividad de quitinasa en ambas cepas. La cepa de *Trichoderma* sp. T-98, no mostró ninguna presencia de halos color púrpura hasta las 72 h, mientras que a las 96 h sí se observó la coloración púrpura en la caja Petri, y a las 120 h toda la caja Petri presentó coloración púrpura. Por su parte, *C. eragrostidis* presentó en todo momento la formación de los halos púrpuras conforme se desarrolló en el medio (Figura 3).

Ensayo cualitativo de β -glucanasa. Para la cepa *Trichoderma* sp. T-98 se consideró positiva para la producción de β -glucanasa al mostrar la formación de halos de aclareamiento alrededor del micelio. Por el contrario, para *C. eragrostidis* se consideró negativa la actividad ya que no formó halos de aclareamiento (Figura 4).

DISCUSIÓN

Las cepas de *Trichoderma* spp. poseen la habilidad de inhibir y desplazar a *C. eragrostidis*, al mismo tiempo, la confrontación de estos microorganismos incrementa la producción de H_2O_2 y actividad de lacasa. Asimismo, los dos hongos presentan cualitativamente actividad de quitinasa y β -glucanasa. La especie de *C. eragrostidis* ya ha sido reportada con anterioridad como agente causal de la MF en el cultivo de piña, así como también como agente causal de la podredumbre postcosecha del fruto (Ferreira et al. 2014).

Los resultados obtenidos indican que las cepas estudiadas de *Trichoderma* poseen la habilidad para inhibir y desplazar a *C. eragrostidis*, esto coincide con Bahekar et al. (2017) quienes reportaron la eficacia *in vitro* de agentes de control sobre *Curvularia lunata* aislada de sábila (*Aloe vera*), se encontró que *T. harzianum* tiene una eficacia del 65.35 % de inhibición, valor similar

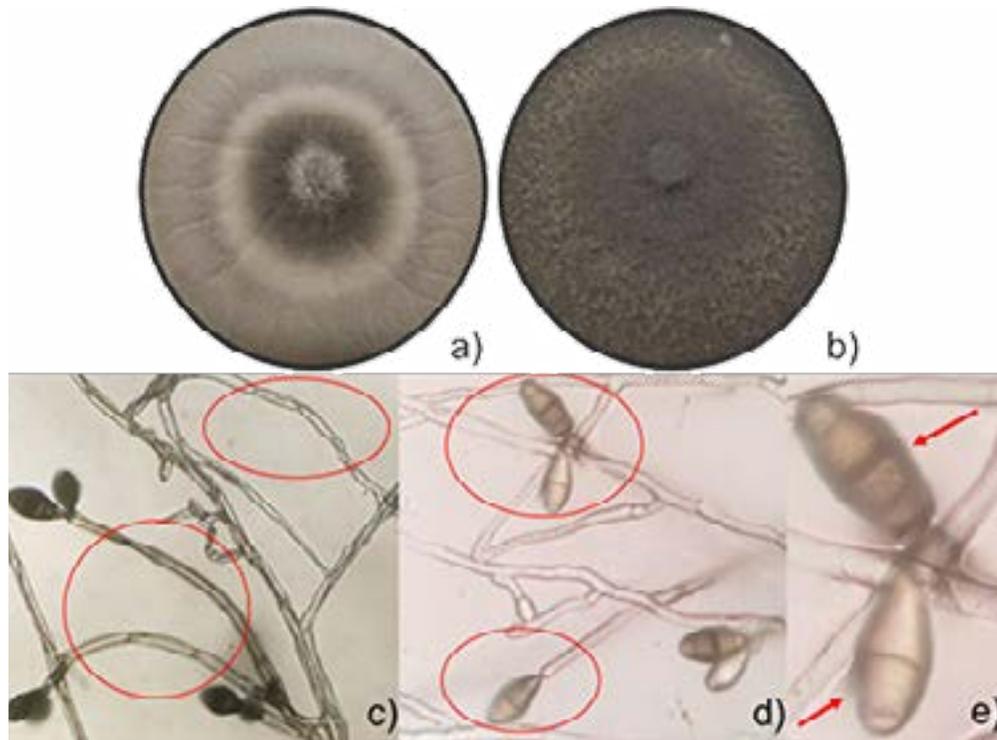


Figura 1. Imagen macroscópica de a) *C. eragrostidis* a 7 dde y b) *C. eragrostidis* de 14 dde, aisladas de cultivos de piña con síntomas de MF. Micromorfología de los mismos presentan el detalle de c) hifas septadas, d) conidióforos y e) conidios de 14 dde (100x).

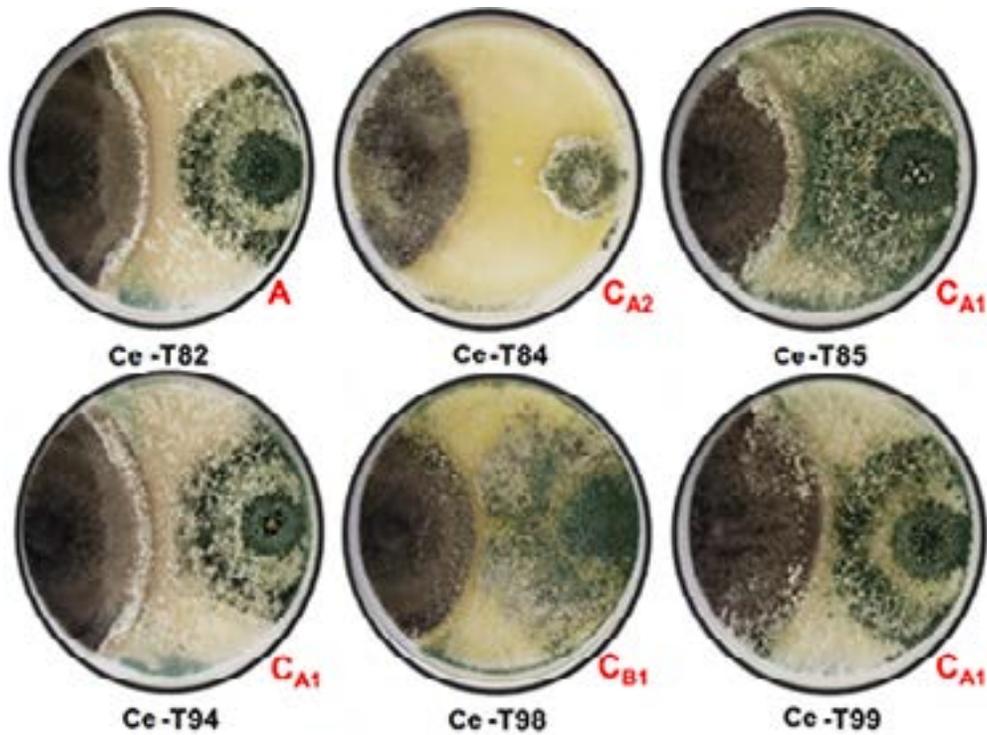


Figura 2. Tipos de interacciones entre *C. eragrostidis* (Ce) y cepas de *Trichoderma* spp. Ce-T82) A= inhibición al contacto. Ce-T84) C_{A2} = reemplazo completo después de una inhibición al contacto. Ce-T85) C_{A1} = reemplazo parcial después de una inhibición al contacto. Ce-T94) C_{A1} = reemplazo parcial después de una inhibición al contacto. Ce-T98) C_{B1} = reemplazo parcial después de una inhibición a distancia. Ce-T99) C_{A1} = reemplazo parcial después de una inhibición al contacto.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición en el crecimiento de *C. eragrostidis* a siete días de interacción con cepas de *Trichoderma* spp.

Cepa de <i>Trichoderma</i> spp.	Inhibición (%)
T-82	50.57±0.17 e
T-84	55.14±0.51 c
T-85	56.51±0.19 b
T-94	53.69±0.26 d
T-98	61.66±0.11 a
T-99	41.73±0.16 f
F=	603.57
P-Valor=	0.00001

Medias con diferente literal son significativamente diferentes entre sí (Tukey test, $P \leq 0.05$).

Tabla 2. Índice de antagonismo entre *C. eragrostidis* a siete días de interacción con cepas de *Trichoderma* spp. según la escala de Badalyan et al. (2004)

<i>Trichoderma</i> spp.	Interacción	IA
T-82	A	1
T-84	C _{A2}	4.5
T-85	C _{A1}	3.5
T-94	C _{A1}	3.5
T-98	C _{B1}	4
T-99	C _{A1}	3.5
IA Total		20

IA= índice de antagonismo

al encontrado con *Trichoderma* sp. T-98 (61.66 %) contra *C. eragrostidis* aislada de piña (*A. comosus*).

En otro estudio, Tekade et al. (2017) evaluaron el efecto de diferentes agentes bioactivos como *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, contra *Curvularia lunata*, aislada de coléo (*Solenostemon blumei*); donde, *T. viride* registró una inhibición del 60.81 %, seguido de *T. harzianum* con 50.71 %. Mientras que, Sunpapao et al. (2018) reportaron a *T. harzianum* TM2/1, y una cepa endofítica de *Trichoderma* V76-12, para el control de la MF causada por *Curvularia oryzae* en hojas de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.), donde el aislado endofítico de *Trichoderma* V76-12 inhibió el crecimiento de *C. oryzae* en 85.71 %, seguido del aislado *T. harzianum* TM2/1 con 75.71 %. Por lo tanto, se demuestra

que *Trichoderma* spp. resultó eficiente como agente bioactivo contra especies de *Curvularia*.

Las interacciones resultantes de los co-cultivos entre *C. eragrostidis* y *Trichoderma* spp. que más frecuencia se obtuvo fue el remplazo parcial después de una inhibición al contacto (C_{A1}), inhibición al contacto (A), remplazo completo después de una inhibición al contacto (CA2), las cuales coinciden con las interacciones encontradas por Badalyan et al. (2004), quienes también reportaron repetidamente estos tipos de interacciones en las confrontaciones de tres especies de *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum* y *T. pseudokoningii*) con distintos hongos xilotróficos. Asimismo, Chan-Cupul et al. (2019) reportaron, que las interacciones resultantes entre la confrontación de *Trichoderma* sp.

Tabla 3. Características bioquímicas de *C. eragrostidis* en interacción con cepas de *Trichoderma* spp.

Tratamientos	Lacasa (U/mg de proteína)	H ₂ O ₂ (mg/L)	Proteína (mg/L)
<i>C. eragrostidis</i>	0.027±0.004 b	0.33±0.04 d	11.33±0.20 cd
Ce-T-82	0.102±0.02 ab	1.28±0.13 c	10.96±1.18 d
Ce-T-84	0.103±0.01 ab	4.38±0.50 b	15.88±0.62 bc
Ce-T-85	0.076±0.01 ab	1.21±0.12 c	16.21±1.73 b
Ce-T-94	0.219±0.07 a	0.74±0.21 cd	8.94±2.26 d
Ce-T-98	0.089±0.03 ab	6.47±0.34 a	22.86±2.53 a
Ce-T-99	0.104±0.03 ab	0.86±0.11 cd	16.13±1.19 b
F=	2.59	79.65	8.56
P-Valor=	0.0402	0.00001	0.00001

Medias en columnas con diferente literal son significativamente diferentes entre sí (Tukey test, $P \leq 0.05$). U es la cantidad de la lacasa que oxida 1 μ mol de ABTS por minuto. Ce = *C. eragrostidis*, T = *Trichoderma* spp.

(SP6) y los hongos de la pudrición blanca (*Pycnoporus sanguineus* y *Trametes maxima*) corresponden con inhibición al contacto (C_{A1}) y reemplazo total después de bloqueo inicial a distancia (C_{B2}), lo que nos sugiere que *Trichoderma* generalmente produce un reemplazo parcial después de una inhibición al contacto, por lo tanto, esta característica es importante, al momento de seleccionar cepas para el control biológico de *C. eragrostidis* en cultivos de importancia económica como lo es la piña.

La capacidad de especies de *Curvularia* para producir lacasa ha sido estudiada por distintos autores. Al respecto, Banerjee y Vohra (1991) reportaron la habilidad de una cepa de *Curvularia* sp. nativa de suelo para producir 0.75 U/L de actividad (volumétrica) lacasa; Neoh *et al.* (2014) reportaron una actividad volumétrica de 30 U/L de lacasa en *C. clavata*; Patel y Bhaskaran (2016) reportaron la capacidad de *C. aerea* (25.4 U/mL), *C. akaii* (18.1 U/mL) y *C. lunata* (166.2 U/mL) para producir lacasa en fermentación líquida (actividad volumétrica). Las lacasas producidas por *Curvularia* están involucradas en una variedad de funciones fisiológicas como la deslignificación, la morfogénesis y el parasitismo. Se ha demostrado que las lacasas y otras enzimas como la beta-glucosidasa producidas por cepas fitopatógenas

de *C. lunata* son las responsables de la degradación de la barberina, una sustancia presente en el follaje de las plantas, durante la patogénesis (Yilmaz *et al.* 2022). Por otro lado, la producción de lacasas y otros compuestos antimicrobianos (filtrados) por cepas no fitopatógenas de *C. lunata* han demostrado efectividad en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* (48%), *Fusarium oxysporum* (18 %) y *Rhizoctonia solani* (80%), demostrando así, el rol de esta enzima en la defensa contra otros hongos en bioensayos de confrontación (Komeil y Saad 2021). Para el caso de las interacciones entre *Trichoderma* spp. y *C. eragrostidis* pudiera ser que los incrementos en la actividad lacasa, también estén involucrados en los mecanismos de defensa, ya que se ha demostrado que *Trichoderma viride* incrementa su actividad de lacasa en presencia de una variedad de microorganismos, incluyendo bacterias y otros hongos (Lakshmanan y Sadasivan 2016). Por otra parte, la producción de H₂O₂ en una especie de *Curvularia* ya ha sido reportada con antelación por Van-Schijndel *et al.* (1994), quienes documentaron la presencia de H₂O₂ en la producción de cloroperoxidasas de vanadio por *Curvularia inaequalis*. Sin embargo, no existen evidencias de la producción de H₂O₂ por especies de *Curvularia* spp. en sistemas de co-cultivo,

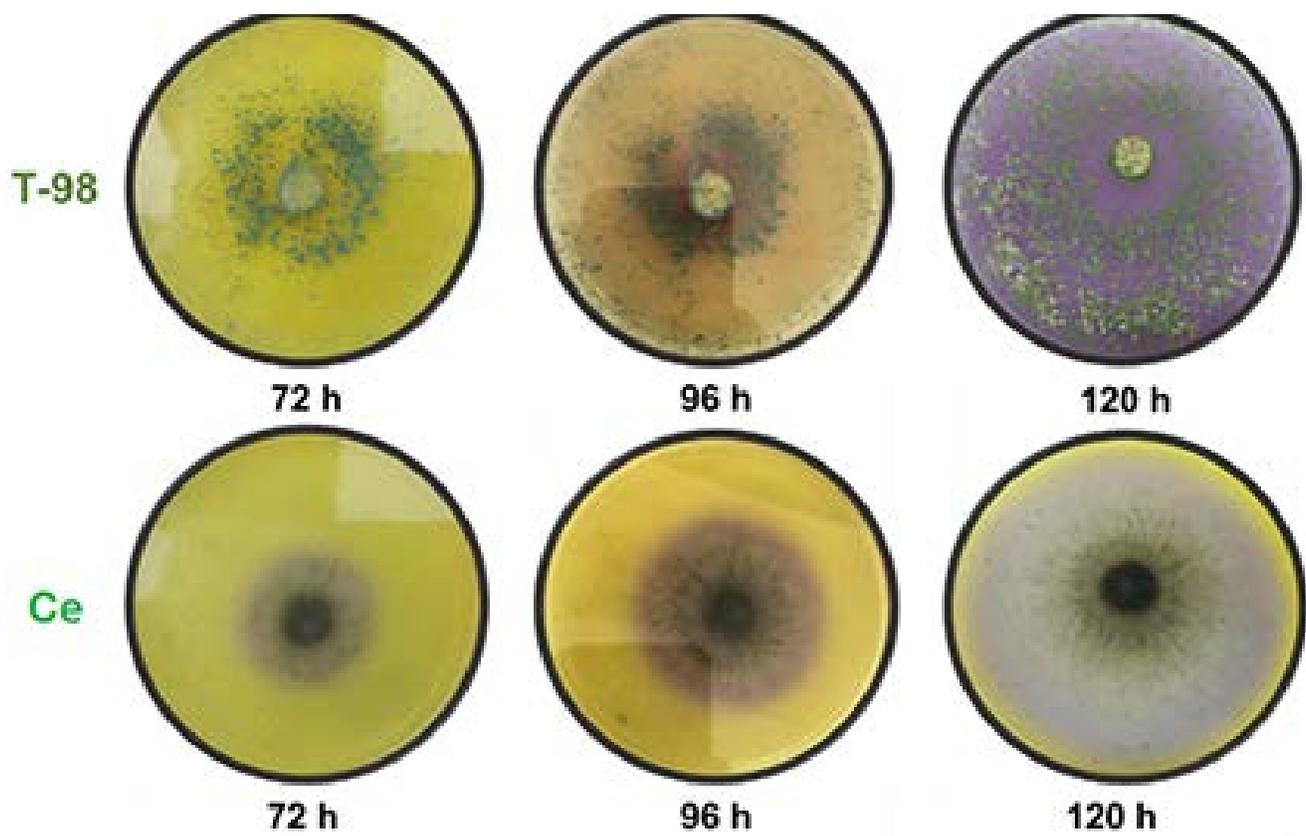


Figura 3. Actividad enzimática cualitativa de quitinasa de las cepas *Trichoderma* sp., T-98 y *C. eragrostidis*, Ce.

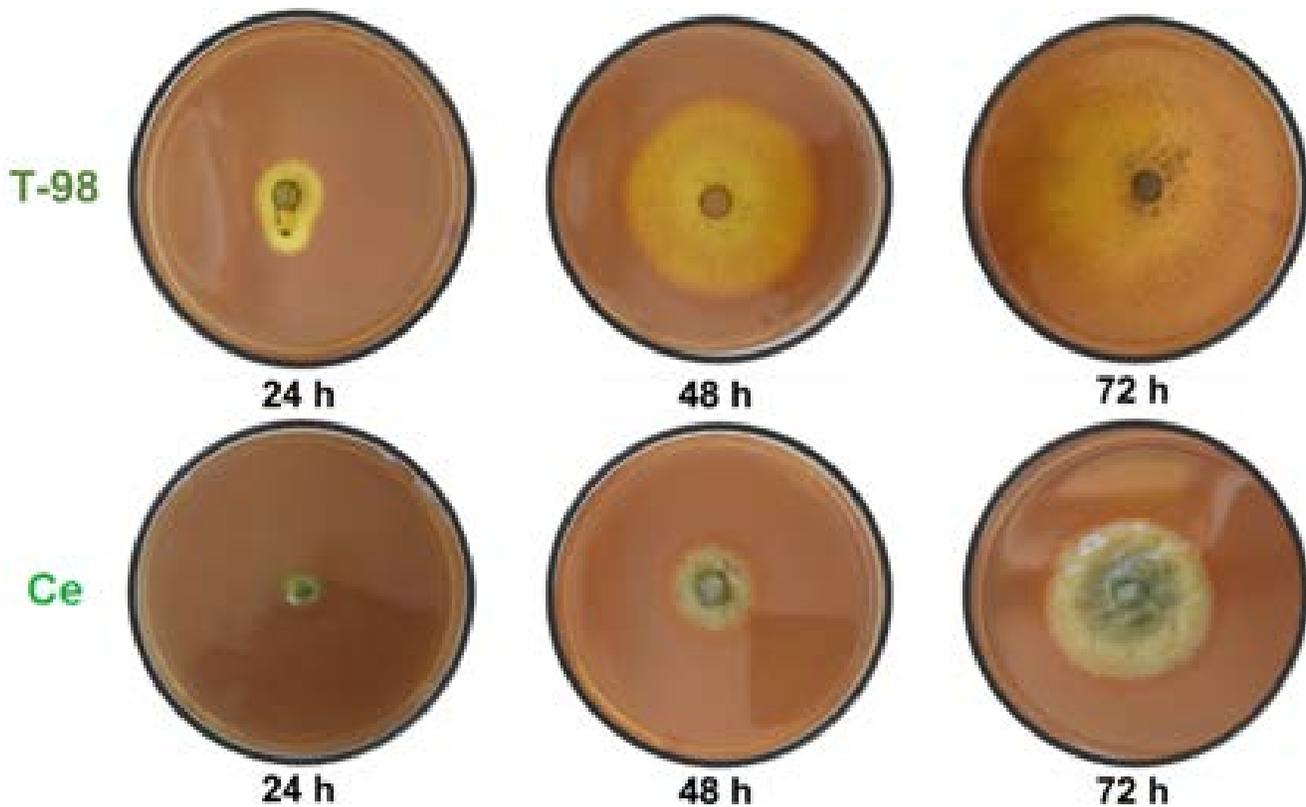


Figura 4. Actividad enzimática cualitativa de β -glucanasa de las cepas *Trichoderma* sp., T-98 y *C. eragrostidis*, Ce.

por lo tanto, se describe por primera ocasión el incremento de H₂O₂ en cultivos duales entre *Trichoderma* spp. y *C. eragrostidis*.

En lo que respecta a la producción de quitinasas y β-glucanasas, se tienen reportes por parte de *Trichoderma* sp. (Di Cologna et al. 2017; Bae et al. 2017), esto se comprobó con la cepa de *Trichoderma* T-98, al inducir la producción de quitinasas y β-glucanasas sobre medios de cultivo sólidos suplementados con quitina de caparazón de camarón y carboximetil-celulosa, respectivamente. Para *Curvularia* sp., Soares et al. (2006) estudiaron la producción cualitativa de quitinasas por *C. eragrostidis* mediante la producción de halos en el medio sólido. En cuanto β-glucanasas, solo existen datos cuantitativos de la capacidad de *Curvularia* sp. para su producción (Okunowo et al. 2010), esto se puede deber a que la producción de β-glucanasas por parte de *Curvularia* sp. no se puede apreciar en la prueba cualitativa, lo que coincidiría con lo obtenido en esta investigación.

Los resultados obtenidos podrían tener diversas aplicaciones, como el control biológico de *C. eragrostidis* en el cultivo de la piña empleando las cepas *Trichoderma* sp. T-84 y T98 como posibles agentes biocontrolados, debido a que presentaron el mayor índice de antagonismo y mayor porcentaje de inhibición, respectivamente. Sin embargo, para ello es necesario establecer un protocolo de producción de esporas de *Trichoderma* sp. T-84 y T98, en fermentación en estado sólido y la evaluación de la efectividad de ambas cepas tanto *in vivo* como *in situ*. En este tenor, Ramírez-Olier et al. (2019) evaluaron antagonismo *in vitro* de *T. asperellum* contra *C. lunata*, donde obtuvieron parasitismo grado cuatro con porcentaje mayor al 90 % de inhibición. En *C. eragrostidis* se ha reportado inhibiciones arriba del 80 % y reemplazos totales en co-cultivos con *Trichoderma* sp. (Tenorio et al. 2019).

Otra aplicación relacionada con las lacasas producidas por *Curvularia* spp. en monocultivo o en interacción con *Trichoderma* spp., es en el mejoramiento de la calidad nutritiva de fuentes fibrosas para su empleo en la alimentación animal, al respecto, Vazquez et al. (2020) produjeron lacasas en co-cultivos entre *C. kusanoi* y especies de *Trichoderma* (*T. viride* y *T. pleuroticola*) en fermentación sólida en salvado de trigo (*Triticum aestivum*) y evaluaron la capacidad degradativa de las lacasas para la designificación de la paja cruda de trigo y digestibilidad *in vitro* del bagazo de caña (*Saccharum officinarum*), como resultado los autores indicaron que

el tratamiento de la paja cruda de trigo y bagazo de caña a través de las lacasas, mejoraron su calidad nutricional al disminuir los componentes fibrosos e incrementaron su digestibilidad *in vitro*.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Trichoderma* spp. inhibieron el crecimiento de *C. eragrostidis*, la cepa con mayor porcentaje de inhibición *Trichoderma* sp. T-98 y presentó un reemplazo parcial después de una inhibición a distancia. La mayoría de las cepas presentaron un reemplazo parcial después de una inhibición al contacto. *C. eragrostidis* produjo actividad lacasa e incrementó al interactuar con *Trichoderma* sp. T-94 en al menos 7.1 veces más. *C. eragrostidis* también produjo H₂O₂ e incrementó su producción como resultado de la confrontación con *Trichoderma* sp. T-98 en al menos 18.6 veces más. *Trichoderma* sp. T-98 produjo cualitativamente quitinasas y β-glucanasas; mientras que, *C. eragrostidis* solo fue capaz de producir quitinasas.

LITERATURA CITADA

- Badalyan SM, Innocenti G, Garibyan NG. 2002. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathology Mediterranean* 41, 200-225. <https://www.jstor.org/stable/26456630>
- Badalyan SM, Innocenti G, Garibyan NG. 2004. Interactions between xylophilic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. *Phytopathology Mediterranean* 43, 44-48. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1733
- Bae SJ, Park YH, Bae HJ, Jeon J, Bae H. 2017. Molecular identification, enzyme assay, and metabolic profiling of *Trichoderma* spp. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 1157-1162. <https://doi.org/10.4014/jmb.1702.02063>
- Bahekar AM, Ingle RW, Kendre VP. 2017. Efficacy of fungicides and bioagent against fungal pathogens of *Aloe vera*. *International Journal of Chemical Studies* 5, 1540-1543.
- Banerjee UC, Vohra RM. 1991. Production of laccase by *Curvularia* sp. *Folia Microbiologica* 36, 343-346. <https://doi.org/10.1007/bf02814506>
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-257. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chan-Cupul W, Aràmbula-Zúñiga C, Fan Z, Heredia-Abarca G. 2019. Oxidative enzymes activity and hydrogen peroxide production in white-rot fungi and soil-borne micromycetes co-cultures. *Annals*

- of Microbiology 69, 171–181. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1413-4>
- Chan-Cupul W, Heredia-Abarca G, Rodríguez-Vázquez R. 2016. Atrazine degradation by fungal co-culture enzyme extracts under different soil conditions. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 51, 298-308. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1128742>
- Di Cologna NDM, Gómez-Mendoza DP, Zanoelo FF, Giannesi GC, de Alencar-Guimarães NC, de Souza Moreira LR. 2017. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus secretomes*: proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzyme and Microbial Technology* 109, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.08.007>
- Doyle J. 1991. DNA Protocols for Plants. In: Hewitt GM, Johnston AWB, Young JPW (eds.). *Molecular techniques in taxonomy*. NATO ASI Series, vol 57. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Ferreira APS, Pinho DB, Machado AR, Pereira OL. 2014. First report of *Curvularia eragrostidis* causing postharvest rot on pineapple in Brazil. *Plant disease* 98, 1277-1277. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-14-0288-PDN>
- García-Ordaz HA, Chan-Cupul W, Buenrostro-Nava MT, Valadez-Ramírez P. 2021. Efectividad in vitro de fungicidas químicos contra *Curvularia eragrostidis* (Henn) J. A. Mey, agente causal de la mancha foliar en piña. *Scientia Agropecuaria* 12, 429-434. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.047>
- Hernández-Mansilla AA, Sierra-Peña A, Carr-Pérez A. 2006. Evaluación in vitro del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitropalantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Fitosanidad* 10, 105-108. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116102003.pdf>
- Karimi K, Ahari AB, Arzanlou M, Amini J, Pertot I. 2017. Comparison of indigenous *Trichoderma* spp. strains to a foreign commercial strain in terms of biocontrol efficacy against *Colletotrichum nymphaeae* and related biocontrol features. *Journal of Plant Diseases and Protection* 124, 453-466. [Doi: 10.1007/s41348-017-0088-6](https://doi.org/10.1007/s41348-017-0088-6)
- Klassen NV, Marchington D, McGowan HC. 1994. H₂O₂ determination by the I3-method and by KMnO₄ titration. *Analytical Chemistry* 66, 2921-2925. <https://doi.org/10.1021/ac00090a020>
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10, 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Komeil DA, Saad MMG. 2021. The antagonistic activity of certain fungal endophytes against some phytopathogenic fungi through their metabolites and extracellular enzymes. *Phytoprotection* 101, 21-30. <https://doi.org/10.7202/1082602ar>
- Lakshmanan D, Sadasivan D. 2016. *Trichoderma viride* laccase plays a crucial role in defense mechanism against antagonistic organism. *Frontiers in Microbiology* 7:741. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00741>
- Liu T, Liu L, Jiang X, Huang X, Chen J. 2009. A new furanoid toxin produced by *Curvularia lunata*, the causal agent of maize *Curvularia* leaf spot. *Canadian Journal of Plant Pathology* 31, 22-27. <https://doi.org/10.1080/07060660909507568>
- Maldonado-Michel MA, Muñoz-Valencia R, Peraza-Campos AL, Pastor-Ramos RC, Valadez-Ramírez P, Parra-Delgado H, Chan-Cupul W. 2021. Antifungal activity of *Swietenia humilis* (Meliaceae: Sapindales) seed extracts against *Curvularia eragrostidis* (Ascomycota: Dothideomycetes). *Journal of Plant Diseases and Protection* 128, 471-479. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00410-1>
- Martínez B, Infante D, Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal* 28, 1-11. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001
- Neoh CH, Lam CY, Lim CK, Yahya A, Ibrahim Z. 2014. Decolorization of palm oil mill effluent using growing cultures of *Curvularia clavata*. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 4397-4408. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2350-1>
- Okunowo WO, Gbenle GO, Osuntoki AA, Adekunle AA, Ojokuku SA. 2010. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by a phytopathogenic *Myrothecium roridum* and some avirulent fungal isolates from water hyacinth. *African Journal of Biotechnology* 9, 1074-1078. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1598>
- Patel R, Bhaskaran L. 2016. Screening of novel ascomycetes for the production of laccase enzyme using different lignin model compounds. *International Journal of Pharma and Bio Science* 74, 452-458. <https://doi.org/10.22376/ijpbs.2016.7.4.b452-458>
- Ramírez-Olier J, Trujillo-Salazar J, Osorio-Echeverri V, Jaramillo-Ciro M, Botero-Botero L. 2019. Antagonismo in vitro de *Trichoderma asperellum* contra *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Universidad de Santander Ingenierías* 18, 159-166. <https://doi.org/10.18273/revuin.v18n2-2019015>
- Rebolledo-Martínez A, Ángel-Pérez AL, Becerril-Román AE, Rebolledo-Martínez L. 2005. Growth analysis for three pineapple cultivars grown on plastic mulch and bare soil. *Interciencia* 30, 758-763. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33911107.pdf>
- Sabando-Ávila F, Molina-Atiencía LM, Garcés-Fiallos FR. 2017. *Trichoderma harzianum* en pre-trasplante aumenta el potencial agronómico del cultivo de piña. *Revista Brasileira de Ciências Agrarias* 4, 410-414. <https://doi.org/10.5039/agraria.v12i4a5468>
- Sharma R, Magotra A, Manhas RS, Chaubey A. 2017. Antagonistic potential of a psychrotrophic fungus: *Trichoderma velutinum* ACR-P1. *Biological Control* 115, 12-17. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.024>

- Soares ACF, Sousa CDS, Garrido MDS, Perez JO, Almeida NSD. 2006. Soil Streptomycetes with *in vitro* activity against the yam pathogens *Curvularia eragrostidis* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Brazilian Journal of Microbiology 37, 456-461. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400010>
- Sunil SM, Renuka PS, Pruthvi K, Swetha M, Malini S, Veena SM. 2011. Isolation, purification and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. Enzyme Research ID.248735. <https://doi.org/10.4061/2011/248735>
- Sunpapao A, Chairin T, Ito SI. 2018. The biocontrol by *Streptomyces* and *Trichoderma* of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* in oil palm seedlings. Biological Control 123, 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.017>
- Tekade A, Koche M, Kothikar R, Surpam A. 2017. Efficacy of fungicides and bioagents against *Curvularia lunata* causing blight of coleus under laboratory conditions. Journal of Medicinal Plants 5, 189-191. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.017>
- Tenorio FA, Dos Santos TMC, Coentro-Montaldo Y, Barroso G, Brito-Neto JS, Guedes-Celestino ELF, Nascimento de Cristo CC. 2018. *In vitro* inhibition of *Curvularia eragrostidis* by the antagonistic fungi *Trichoderma* spp. and *Acremonium cephalosporium*. International Journal of Agriculture Innovations and Research 6, 64-366. https://ijair.org/administrator/components/com_jresearch/files/publications/IJAIR_2790_FINAL.pdf
- Van-Schijndel JW, Barnett P, Roelse J, Vollenbroek EG, Wever R. 1994. The stability and steady-state kinetics of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. European Journal of Biochemistry 225, 151-157. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00151.x>
- Vazquez MA, Valiño-Cabrera EC, Torta L, Laudicina VA, Mirabile G. 2020. Evaluación del potencial ligninolítico de las lacasas de *Curvularia kusanoi* L7 para su empleo en la producción animal. Cuban Journal of Agricultural Science 54, 157-167. <http://scielo.sld.cu/pdf/cjas/v54n2/2079-3480-cjas-54-02-157.pdf>
- Yilmaz D, Gizem-Avci F, Sariyar-Akbulut B. 2022. *Curvularia lunata*: a fungus for possible berberine transformation. International Journal of Secondary Metabolite 9, 66-73. <https://doi.org/10.21448/ijsm.996589>
- Zhong LC, Ai YJ, Chun RH, Yi YD. 2016. Identification of *Curvularia clavata* causing leaf spot on pineapple (*Ananas comosus*) in China. Canadian Journal of Plant Pathology 38, 250-253. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1158743>