

Efecto de Quitosan y Metabolitos de *Trichoderma parareesei* en el crecimiento de *Fusarium oxysporum*

Effect of Chitosan and Metabolites of *Trichoderma parareesei* on *Fusarium oxysporum* growth

Hernández-Domínguez, C.¹, Vázquez-Moreno, F.¹, Cruz-Pantoja, A. J.², Orduño-Cruz, N.³, Domínguez-Perales, L. A.¹, Vázquez-Cruz, F.¹.

¹Facultad de Ingeniería Agrohidráulica, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Av. Universidad S/N, San Juan Acateno, Teziutlán Puebla 73965, México; ²Instituto Tecnológico Superior de Zacapoaxtla, carretera Acuaco-Zacapoaxtla Km. 8, Col. Totoltepec, 73680, Zacapoaxtla Puebla, México. ³Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Hernández-Domínguez, C., Vázquez-Moreno, F., Cruz-Pantoja, A. J., Orduño-Cruz, N., Domínguez-Perales, L. A., Vázquez-Cruz, F. (2021). Effect of Chitosan and Metabolites of *Trichoderma parareesei* on *Fusarium oxysporum* growth. *Revista Bio Ciencias*, e867. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.08.e867>



ABSTRACT

Information about the effects of antimicrobial and antagonistic products on the growth of phytopathogens is pivotal in agriculture to achieve effective management strategies in the field or greenhouse. This research aimed to analyze the *in vitro* growth and antagonism of *Trichoderma parareesei* and *Fusarium oxysporum* when exposed to different concentrations of chitosan (1, 4, 6, 8, 10, and 12 mg • mL⁻¹). Such dosages were supplemented with metabolites of *T. parareesei* filtered on cellophane paper and adhered to the culture medium on which the phytopathogen was grown. The diffusion of metabolites at each dose was evaluated prior to incorporating *F. oxysporum*. Obtained data showed significant difference between the growth and inhibition of the fungi on chitosan ($F_{9,35} = 4.47, p < 0.001$), the dose of 1 mg • mL⁻¹ induced greater mycelial growth

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: November 13th 2019.

Accepted/Aceptado: July 03th 2021.

Available on line/Publicado: July 27th 2021.

RESUMEN

Conocer el efecto de productos antimicrobianos y antagonistas sobre el crecimiento de fitopatógenos es de relevancia en la agricultura al integrarlos como estrategia de manejo en campo o invernadero. El objetivo de este trabajo fue analizar el crecimiento y antagonismo *in vitro* de *Trichoderma parareesei* y *Fusarium oxysporum* sobre diversas concentraciones de quitosan (1, 4, 6, 8, 10, y 12 mg • mL⁻¹). Estas mismas dosis fueron suplementadas con metabolitos de *T. parareesei* filtrados en papel celofán adherido al medio de cultivo sobre el cual se creció el fitopatógeno. La difusión de metabolitos en cada dosis fue evaluada antes de incorporar a *F. oxysporum*. Los resultados del análisis estadístico mostraron diferencia significativa entre el crecimiento e inhibición de los hongos sobre quitosan ($F_{9,35} = 4.47, p < 0.001$), la dosis de 1 mg • mL⁻¹ indujo mayor crecimiento de micelio en el fitopatógeno, disminuyendo conforme incrementó la dosis de quitosan. Para el caso *T. parareesei* las dosis utilizadas no limitaron su desarrollo y crecieron 93 % más que *F. oxysporum*, y la mayor inhibición para ambos casos fueron 6 y 12 mg • mL⁻¹. El área de

*Corresponding Author:

Carmela Hernández-Domínguez. Facultad de Ingeniería Agrohidráulica, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Av. Universidad S/N, San Juan Acateno, Teziutlán Puebla 73965, México. Phone: (595) 952 89 69. E-mail: Carmela.hernandezd@correo.buap.mx

on the phytopathogen, decreasing as the dose of chitosan increased. In the case of *T. parareesei*, the doses used did not limit its development and growth 93 % more than *F. oxysporum*, and the greatest inhibition for both cases were achieved with 6 and 12 mg • mL⁻¹. The area of diffusion of metabolites of *T. parareesei* increased in relation to the chitosan dose, and although this was not related to the reduction of *F. oxysporum* growth, there was a synergistic effect between chitosan and secondary metabolites.

KEY WORDS

Antagonists, antimicrobials, dose, phytopathogens, reduction.

Introduction

Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* is one of the diseases that most affect crops, causing considerable losses (De Granada *et al.*, 2001). Due to its importance, several researchers have searched for alternatives for its management, however, the results have been unsuccessful. Therefore, nowadays researchers are focusing on options such as biological and natural methods to ameliorate the damage caused by this fungus.

In this regard, studies with antifungal agents of natural origin, such as chitosan, have been studied in the management of phytopathogenic fungi due to some attributable antimicrobial activities (Roller & Covill, 2000; Allan & Hardwiger, 1979). In accordance with the above, authors such as Prapagdee *et al.* (2007) have reported inhibition of spore germination of *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium solani* f. sp. *glycines* by chitosan. Additional data are provided by Guo *et al.* (2006), who linked the high molecular weight of chitosan with the inhibition of mycelial growth of *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* and *Valsa mali*, Palma-Guerrero *et al.* (2008); Rabea *et al.* (2009) observed inhibition of spore germination of *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* up to 90 and 100 % respectively. Similarly, Hernandez-Lauzardo *et al.* (2008); Singh *et al.* (2008) reported that increasing chitosan concentration causes excessive branching, vacuolation and reduction of hyphal diameter, the most effective concentrations being 1.5 and 2.0 mg • mL⁻¹

difusión de metabolitos de *T. parareesei* se incrementó en relación a la dosis de quitosán evaluada, y aunque esta no tuvo relación con la reducción del crecimiento de *F. oxysporum*, hubo un efecto sinérgico entre el quitosán y metabolitos secundarios.

PALABRAS CLAVE

Antagonistas, antimicrobianos, dosis, fitopatógenos, reducción.

Introducción

El marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium oxysporum*, es una de las enfermedades que más afecta a los cultivos ocasionando pérdidas considerables (De Granada *et al.*, 2001). Debido a su importancia, varios investigadores han buscado alternativas para su manejo, sin embargo, los resultados han sido pocos exitosos, de ahí que en la actualidad se siguen buscando opciones como los métodos biológicos y naturales para contrarrestar el daño por este hongo.

Al respecto, estudios con agentes antifúngicos de origen natural, tales como el quitosán han sido estudiados en el manejo de hongos fitopatógenos debido a las propiedades antimicrobianas que posee (Roller & Covill, 2000; Allan & Hardwiger, 1979). Así mismo, autores como Prapagdee *et al.* (2007) han reportado inhibición en la germinación de esporas de *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium solani* f. sp. *glycines* por este agente microbiológico. Otros resultados son los proporcionados por Guo *et al.* (2006), quienes observaron que el quitosán de alto peso molecular causó la inhibición del crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Valsa mali*, Palma-Guerrero *et al.* (2008); Rabea *et al.* (2009) observaron inhibición de la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae* hasta 90 y 100 % respectivamente. De igual manera, Hernández-Lauzardo *et al.* (2008); Singh *et al.* (2008) observaron que el incremento en la concentración provoca excesivas ramificaciones, vacuolación y reducción del diámetro de hifas siendo las concentraciones más efectivas 1.5 y 2.0 mg • mL⁻¹.

A pesar de que hay estudios del efecto antimicrobiano de este biopolímero, los resultados indican una respuesta variable y depende del grado de deacetilación,

Previous studies of the antimicrobial effect of this biopolymer indicated a variable response associated to the deacetylation degree, molecular concentration and cellular response of the treated microorganism, there were also described biological effectiveness for some fungi and tolerance for others such as *Trichoderma* (Rabea et al., 2009). The *Trichoderma* genus comprises fungi with great potential in the management of several phytopathogenic fungi including *Fusarium oxysporum* which is poorly affected by chitosan (Melia & Ariantha, 2010; Abou et al., 2007), such features make them suitable for studies of additive or synergistic effects using chitosan. However, the combination of secondary metabolites with chitosan has been little studied and the antagonistic and synergistic reactions of these mixtures are still unknown; for this reason, this work aimed to analyze the growth of *Fusarium oxysporum* on secondary metabolites of *Trichoderma parareesei* with different doses of chitosan.

Material and Methods

Obtaining strains

The strains VB19IF1 belonging to *Fusarium oxysporum* and VB10IT2 to *Trichoderma parareesei* obtained from the collection of the Faculty of Agrohydraulic Engineering of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla were used, and then they were propagated on Potato Dextrose Agar (PDA; brand MCD-Lab) at 31 ± 2 °C during four days.

Growth of *F. oxysporum* and *T. parareesei* on chitosan

Six concentrations of chitosan (Table 1) (Sigma-Aldrich, 85 % distillation grade) were used for the experiment and then mixed with PDA culture medium in Petri dishes. After 24 hours at room temperature, 0.5 cm diameter circles of 4-day-old *F. oxysporum* and *T. parareesei* growth were placed in the center of each Petri dish, ensuring that the mycelium remained in contact with the medium. The control consisted of seeding both fungi on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) medium without chitosan. All plates were incubated at 31 ± 2 °C until the control filled the Petri dish. Growth was measured every 24 hours through photographs obtained with a scanner (Epson L575), which were edited with the Gim Map software (Version 2.8), and the growth diameter was determined with the Image tool software (version 3.0).

concentración molecular y respuesta celular del microorganismo tratado, observándose efectividad biológica para algunos hongos y tolerancia para otros como *Trichoderma* (Rabea et al., 2009). El género *Trichoderma* es un hongo con gran potencial en el manejo de varios hongos fitopatógenos incluyendo *Fusarium oxysporum* y es poco afectado por quitosán (Melia & Ariantha, 2010; Abou et al., 2007) características que lo hacen un buen candidato para realizar estudios de efecto aditivo o sinérgico con el biopolímero. Sin embargo, la combinación de metabolitos secundarios con quitosán, ha sido poco estudiado y se desconocen las reacciones antagonicas y sinérgicas al realizarse estas mezclas, por lo tanto, éstas deberían ser analizadas más a fondo. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en metabolitos secundarios de *Trichoderma parareesei* con diferentes dosis de quitosán.

Material y Métodos

Obtención de cepas

Se utilizaron las cepas VB19IF1 perteneciente a *Fusarium oxysporum* y VB10IT2 a *Trichoderma parareesei* obtenidas de la colección de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, las cuales fueron propagadas en Agar Dextrosa Papa (PDA; marca MCD-Lab) a 31 ± 2 °C por 4 días.

2.2 Crecimiento de *F. oxysporum* y *T. parareesei* sobre quitosán

Para el experimento se emplearon seis concentraciones de quitosán (Tabla 1) (Sigma-Aldrich, 85 % grado de destilación) las cuales se mezclaron con medio de cultivo PDA en cajas Petri. Después de 24 horas mantenidas a temperatura ambiente, círculos de 0.5 cm de diámetro del crecimiento de *F. oxysporum* y *T. parareesei* de cuatro días de edad fueron colocados en el centro de cada caja Petri, procurando que el micelio quedara en contacto con el medio. El testigo consistió en sembrar ambos hongos en medio Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) sin quitosán. Todas las cajas fueron incubadas a 31 ± 2 °C hasta que el testigo llenara la caja. El crecimiento fue medido cada 24 horas a través de fotografías obtenidas con un escáner (Epson L575), las cuales fueron editadas con el programa Gim Map (Versión 2.8), y el diámetro de crecimiento fue determinado con el programa Image tool (versión 3.0).

Growth of *F. oxysporum* in the presence of chitosan and secondary metabolites of *T. parareesei*.

For the evaluation of secondary metabolites, PDA culture medium was prepared with six different concentrations of chitosan (Table 1), each treatment obtained was placed in Petri dishes, and a 90 cm diameter circle of cellophane paper was placed on the culture medium of each dish, then all treatments were stored for 24 hours at room temperature.

Thereafter, 0.5 cm circles of *T. parareesei* were incorporated and grown at 31 ± 2 °C for 48 hours on the cellophane paper in the center of each dish. Subsequently, the growth was stopped by removing the cellophane paper, leaving the filtered *Trichoderma* metabolites on the culture medium. The area occupied by the metabolites was observed under UV light and measured through photographs captured with a Bio-Rad Gel Doc 2000 equipment (CCD camera, Bio-Rad). The photographs were edited and measured according to the methodology mentioned in the previous section. Subsequently, in the center of the area occupied by the filtered metabolites, 0.5 cm diameter circles with four-day-old *F. oxysporum* growth were placed and incubated at 31 ± 2 °C until the control filled the Petri dish. Growth was measured following the methodology mentioned in the previous section.

Experimental design and statistical analysis

In all assays, a completely randomized experimental design was used, each treatment included four replicates and two replicates simultaneously. The fungal growth data were analyzed through ANOVA and Tukey mean comparison tests with a significance level $p < 0.001$ using SAS statistical package (Version 9.0) for Windows. To determine the percentage inhibition of mycelial development (PID), the formula was used, where: DM_{trat} = mycelial development in the treatment with chitosan, DM_{TA} = mycelial development in the absolute control. To assess the association between the growth area of *F. oxysporum* and the area of metabolite diffusion, a simple regression analysis was performed taking the experimental units that presented different areas of metabolite diffusion, but equal doses of chitosan.

The synergy (SF) between *T. parareesei* (Tp3) and chitosan (Qs11) was evaluated using Bliss independence model (Xuet *et al.*, 2011). The expected percentage of disease development for combined use (Tp3, Qs) was calculated as

Crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de quitosán y metabolitos secundarios de *T. parareesei*.

Para la evaluación de metabolitos secundarios se preparó medio de cultivo PDA con seis diferentes concentraciones de quitosán (Tabla 1), cada tratamiento obtenido fue colocado en cajas Petri, y sobre el medio de cultivo de cada caja se colocó un círculo de 90 cm de diámetro de papel celofán, posteriormente todos los tratamientos fueron almacenados por 24 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, círculos de 0.5 cm de *T. parareesei* fueron incorporados y crecidos a 3 ± 2 °C por 48 horas sobre el papel celofán en el centro de cada caja. Posteriormente, el crecimiento fue retirado al quitar el papel celofán, quedando sobre él medio de cultivo los metabolitos filtrados de *Trichoderma*. El área ocupada por los metabolitos fue observada en luz ultravioleta y medida a través de fotografías tomadas con un equipo Bio-Rad Gel Doc 2000 (cámara CCD, Bio-Rad). Las fotografías fueron editadas y medidas de acuerdo a la metodología mencionada en el apartado anterior. Posteriormente, en el centro del área ocupada por los metabolitos filtrados, se colocaron círculos de 0.5 cm de diámetro con crecimiento de *F. oxysporum* con cuatro días de edad, los cuales fueron incubados a 31 ± 2 °C hasta que el testigo llenara la caja. Todos los crecimientos fueron medidos de acuerdo a la metodología mencionada en el apartado anterior.

Diseño experimental y análisis estadísticos

En todos los ensayos se realizó un diseño experimental completamente al azar, cada tratamiento con cuatro replicas y dos repeticiones en tiempo. Los datos de crecimiento de los hongos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia $p < 0.001$ con el paquete estadístico SAS para Windows (Versión 9.0). Para determinar el porcentaje de inhibición del desarrollo micelial (PID) se utilizó la fórmula, donde: DM_{trat} = Desarrollo micelial en el tratamiento con quitosán, DM_{TA} = Desarrollo micelial en el testigo absoluto. Con el fin de conocer la asociación entre el área de crecimiento de *F. oxysporum* y el área de difusión de metabolitos se realizó un análisis de regresión simple tomando las unidades experimentales que presentaron diferente área de difusión de metabolitos, pero igual dosis de quitosán.

La sinergia (SF) entre *T. parareesei* (Tp3) y quitosán (Qs11) se evaluó utilizando la independencia de Bliss

the product of two individual control agents (CA) (Tp3 and Qs11) (i.e., $Tp3, Qs11 = Tp3 \times Qs11$). If treatment efficacy is defined as $ETp3, Qs11 = 1 - Tp3, Qs11$, then $1 - ETp3 / Qs11 = (1 - ETp3) \times (1 - EQs11)$. The algebraic simplification of this equation derives from the formula used: $ETp3, Qs11 = ETp3 + EQs11 - (ETp3 \times EQs11)$ (Xu et al., 2011). When $SF = 1$, the interaction between CA is additive; when $SF < 1$, the interaction is antagonistic; and when $SF > 1$, the interaction is synergistic.

Results and Discussion

Growth of *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma parareesei* on chitosan.

The analysis of fungal growth on chitosan doses showed a statistical difference ($F_{9,35} = 4.47, p < 0.001$), the dose of $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ induced greater mycelial growth in the phytopathogen, decreasing as the chitosan dose increased (Table 1). Abou et al. (2007) found a correlation between growth and dose, i.e. the higher the dose, the lower the growth of *F. oxysporum*, however, in this study such codependence was not evident. A research conducted by Al-Hetar et al. (2011) shows the effect of chitosan on the growth of *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4, highlighting the morphological changes and low emergence of germ tubes. Similar results were reported by Melia & Ariantha (2010), when working with chitosan they found mutations in *F. oxysporum* and *Trichoderma*, as well as greater effectiveness in doses higher than 2.5 %.

Regarding the growth of *T. parareesei*, all the doses used in this experiment had a similar effect to the control, i.e., no dose of chitosan limited mycelial development (Table 1). Abou et al. (2007), Chittenden & Singh (2009), who observed growth of *T. harzianum* at different doses of chitosan and found no lethal response to the doses tested; however, the mutants obtained from these strains changed their antagonistic action, highlighting their growth at doses of 3.00 and $4.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

On the other hand, the percentage of inhibition of the biopolymer according to the doses evaluated on the phytopathogen and antagonist was different, the highest inhibition for both cases were between 6 and $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ with a percentage of 12.6 and 9.3 % for *F. oxysporum*, while *T. parareesei* presented 11 and 18 % (Figure 1). These results are possible since chitosan has fungicidal properties. In this regard, Roller & Covill, (2000)

(Xuet et al., 2011). El porcentaje esperado del desarrollo de la enfermedad para uso combinado (Tp3, Qs) se calculó como el producto de dos agentes de control (CA) individuales (Tp3 y Qs11) (es decir, $Tp3, Qs11 = Tp3 \times Qs11$). Si la eficacia del tratamiento se define como $ETp3, Qs11 = 1 - Tp3, Qs11$, entonces $1 - ETp3 / Qs11 = (1 - ETp3) \times (1 - EQs11)$. La simplificación algebraica de esta ecuación deriva de la fórmula utilizada: $ETp3, Qs11 = ETp3 + EQs11 - (ETp3 \times EQs11)$ (Xu et al., 2011). Cuando $SF = 1$, la interacción entre los CA es aditiva; cuando $SF < 1$, la interacción es antagónica; y cuando $SF > 1$, la interacción es sinérgica.

Resultados y Discusión

Crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma parareesei* sobre quitosán.

El análisis de crecimiento de los hongos sobre las dosis de quitosán mostró diferencia estadística ($F_{9,35} = 4.47, p < 0.001$), la dosis de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ indujo mayor crecimiento de micelio en el fitopatógeno, disminuyendo este conforme incrementó la dosis de quitosán (Tabla 1). Al respecto Abou et al. (2007) encontraron una correlación entre el crecimiento y dosis, es decir a mayor dosis disminuyó el crecimiento de *F. oxysporum*, sin embargo, en éste estudio esta codependencia no fue tan clara. Estudios realizados por Al-Hetar et al. (2011) muestran el efecto de quitosán sobre el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4, estos autores destacan los cambios morfológicos y baja emergencia de tubos germinativos. Resultados similares fueron reportados por Melia & Ariantha (2010), al trabajar con éste biopolímero encontraron mutaciones en *F. oxysporum* y *Trichoderma*, así como una mayor efectividad en dosis mayores a 2.5 %.

Con respecto al crecimiento de *T. parareesei*, todas las dosis utilizadas en éste experimento tuvieron efecto similar al testigo, es decir, ninguna dosis de quitosán limitó el desarrollo del micelio (Tabla 1). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Abou et al. (2007), Chittenden & Singh, (2009), quienes observaron crecimiento de *T. harzianum* en diferentes dosis de quitosán no encontrando respuesta letal a las dosis probadas, sin embargo los mutantes obtenidos de éstas cepas cambiaron su acción antagónica, resaltando su crecimiento con dosis de 3.00 y $4.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Por otra parte, el porcentaje de inhibición del biopolímero de acuerdo a la dosis evaluadas sobre el fitopatógeno y

Table 1.
Growth of *F. oxysporum* and *T. parareesei* on SDA medium with chitosan.

Tabla 1.
Crecimiento de *F. oxysporum* y *T. parareesei* en medio SDA con quitosán.

Treatments	Growth (Cm ²)	
(Doses of chitosan)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichoderma parareesei</i>
1 mg • mL ⁻¹	5.91 ^a	50.26 ^a
4 mg • mL ⁻¹	3.42 ^b	50.26 ^a
6 mg • mL ⁻¹	3.14 ^b	45.01 ^a
8 mg • mL ⁻¹	3.31 ^b	50.26 ^a
10 mg • mL ⁻¹	2.77 ^b	46.62 ^a
12 mg • mL ⁻¹	2.62 ^b	41.42 ^a
control	3.09 ^b	50.26 ^a

suggest that there is less effectiveness in fungi that bear chitosan in its cell wall, for example it is known that the cell wall of *F. oxysporum* presents FIS, 3-gluco-galactomannan of complex structure, FII, p-1,3-glucan and F4, complex formed by chitin and B-1,3-glucan (Alfonso *et al.*, 1992); therefore, such fungi should be sensitive to this biopolymer given that its natural presence does not generate adverse effects for these microorganisms (Lárez, 2008). In addition, to observe its effectiveness in both cases it is necessary to find the appropriate dose for each situation, as well as to carry out detailed studies for the different development stages, since recent studies have shown that chitosan is more effective on conidia than on the hyphae of some phytopathogenic fungi (Palma-Guerrero *et al.*, 2008).

antagonista fue diferente, la mayor inhibición para ambos casos fueron 6 y 12 mg • mL⁻¹ con un porcentaje de 12.6 y 9.3 % para el caso de *F. oxysporum*, mientras que para *T. parareesei* fue de 11 y 18 % (Figura 1). Estos resultados son posibles debido a que quitosán posee cualidades fungicidas que inhiben diversas especies de hongos. Al respecto, Roller & Covill, (2000) sugieren que existe menos efectividad en aquellos que lo poseen en su pared celular por ejemplo se conoce que la pared celular de *F. oxysporum* presenta FIS, 3-gluco-galactomannano de estructura compleja, FII, p-1,3-glucano y F4, complejo formado por quitina y B-1,3-glucano (Alfonso *et al.*, 1992) por lo que éste hongos deberían ser sensibles a éste biopolímero debido a que su presencia natural no genera efectos adversos para estos microorganismos (Lárez, 2008), por lo tanto, para observar su efectividad en ambos casos se deberá encontrar la dosis adecuada para cada situación, así como realizar estudios

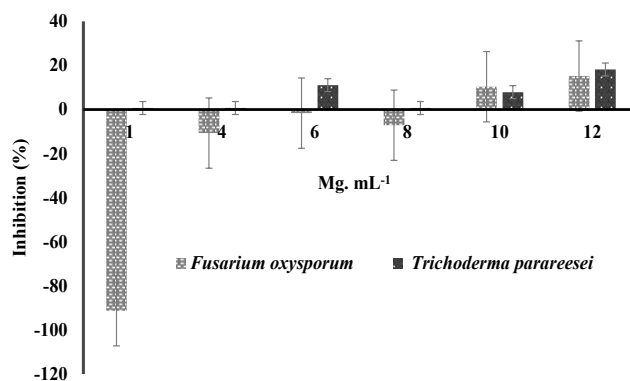


Figure 1. Growth inhibition of *F. oxysporum* and *T. parareesei* on SDA medium with different doses of chitosan.

Figura 1. Inhibición de crecimiento de *F. oxysporum* y *T. parareesei* en medio SDA con diferentes dosis de quitosán.

With respect to *Trichoderma*, Kowsari *et al.* (2014), showed that this fungus treated with doses higher than 1% of chitosan can undergo mutations and expresses the chitinase gene, which makes them more effective in the control of phytopathogenic diseases, however it is necessary to perform additional physiological and morphological studies to evaluate potential adverse effects of the biopolymer on *Trichoderma*.

Growth of *F. oxysporum* in the presence of chitosan and secondary metabolites of *T. parareesei*

A statistical difference was observed between the area occupied by metabolites diffused from *T. parareesei* at different doses ($F_{5,23} = 4.61$, $p < 0.001$), finding that the higher the dose, the greater the area occupied by metabolites (Figure 1), maintaining this tendency up to a dose of $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Similar results were found by Sandhya *et al.* (2005) who determined that 0.5 % colloidal chitin can enhance the production of chitinases in *T. harzianum*.

Moreover, the correlation analysis shows a medium association between the area of metabolite diffusion and the growth of *F. oxysporum* ($R = 0.3754$). This suggests that the effect on the reduction of *F. oxysporum* growth when exposed to secondary metabolites of *Trichoderma* plus chitosan does not depend on the amount of metabolites diffused in the medium, but factors such as the concentration and type of metabolites secreted and the dose of chitosan added must be considered (Figure 2).

detallados para los diversos estados de desarrollo, debido a que estudios recientes han demostrado que quitosán es más efectivo sobre conidios que sobre las hifas de algunos hongos fitopatógenos (Palma-Guerrero *et al.*, 2008).

Para el caso de *Trichoderma*, Kowsari *et al.* (2014), muestran que este hongo tratado con dosis superiores a 1 % de quitosán es capaz de sufrir mutaciones y expresa el gen de la quitinasa, lo que los hace más efectivos en el control de enfermedades fitopatógenas, sin embargo, es necesario realizar estudios fisiológicos y morfológicos que descarten la posibilidad de un efecto adverso del biopolímero sobre *Trichoderma*.

Crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de quitosán y metabolitos secundarios de *T. parareesei*

Se observó diferencia estadística entre el área ocupada por metabolitos difundidos de *T. parareesei* en diferentes dosis ($F_{5,23} = 4.61$, $p < 0.001$), encontrando que a mayor dosis mayor área ocupada por metabolitos (Figura 1), manteniendo esta tendencia hasta la dosis de $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Resultados similares fueron encontrados por Sandhya *et al.* (2005) quienes determinaron que la quitina coloidal al 0.5 % es capaz de potenciar la producción de quitinasas en *T. harzianum*.

Por otra parte, el análisis de correlación muestra mediana asociación entre el área de difusión de metabolitos y el crecimiento de *F. oxysporum* ($R = 0.3754$). Esto sugiere que el efecto en la reducción de crecimiento de *F. oxysporum* sobre metabolitos secundarios de *Trichoderma* más quitosán no depende de la cantidad de metabolitos difundidos en el medio, si no, de otros factores tales como la concentración y tipo de metabolitos segregados y la dosis de quitosán agregada (Figura 2).

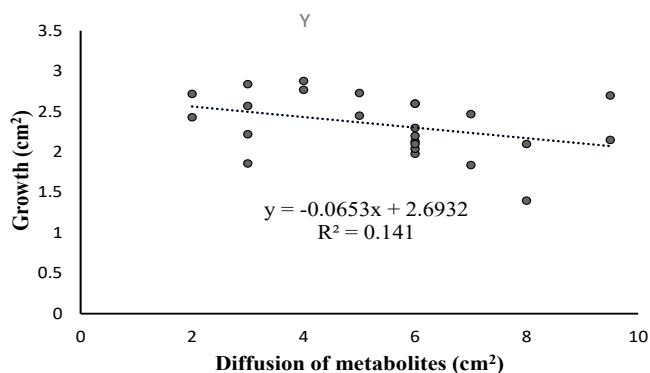


Figure 2. Association between the diffusion of secondary metabolites of *T. parareesei* in SDA with different doses of chitosan and the growth area of *F. oxysporum*.

Figura 2. Asociación entre la difusión de metabolitos secundarios de *T. parareesei* en SDA con diferentes dosis de quitosán y el área de crecimiento de *F. oxysporum*.

According to this result, Abou *et al.* (2007) mentioned that the increase in the antagonistic action of mutant strains obtained from treatments with doses of chitosan may be the result of an increase in the concentration of secondary metabolites, and as mentioned Hermosa *et al.* (2014), *Trichoderma* produces hydrolytic enzymes such as β -1,3-glucanase and chitinases in addition to proteinase enzymes which affect the growth of other fungi such as *F. oxysporum*.

With respect to the growth area of *F. oxysporum* in the presence of metabolites of *T. parareesei* plus chitosan, a synergistic effect was determined at doses of $6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, since growth decreased when adding these two components in contrast to the use of chitosan alone (Table 2), which was also observed when comparing the control *F. oxysporum* grown only in metabolites.

Results obtained by Erayya *et al.* (2018) on mixtures assays, indicate that the optimum dose of copper hydroxide and chitosan to be used in combination with *Trichoderma* is 250 to 500 ppm to effectively control the plant disease. While Chittenden & Singh, (2009) showed that the combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan inhibited spore germination and therefore colony formation as compared using chitosan alone, which only retards germination.

On the other hand, this synergistic action did not occur with doses of $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, which could be explained by the existence of unstable mutant strains that

De acuerdo con este resultado, Abou *et al.* (2007) menciona que el incremento en la acción antagónica de cepas mutantes obtenidas de tratamientos con dosis de quitosán puede ser resultado de un incremento en la concentración de metabolitos secundarios, y como menciona Hermosa *et al.* (2014), *Trichoderma* produce enzimas hidrolíticas tales como β -1,3-glucanasa y quitinasas además de enzima proteinasa las cuales afectan el crecimiento de otros hongos tales como *F. oxysporum*.

Con respecto al área de crecimiento de *F. oxysporum* en presencia de metabolitos de *T. parareesei* más quitosán se determinó un efecto sinérgico en dosis de $6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ debido a que hubo menor crecimiento al sumar estos dos componentes a diferencia de usar sólo quitosán (Tabla 2), lo que también se observa al comparar el testigo *F. oxysporum* crecido solo en metabolitos.

Resultados obtenidos por Erayya *et al.* (2018) al hacer mezclas, indican que la dosis óptima del hidróxido de cobre y quitosán para usarse en combinación con *Trichoderma* es de 250 a 500 ppm para dañar efectivamente la enfermedad de la planta. Mientras que Chittenden & Singh, (2009) muestran que la combinación de *Trichoderma harzianum* y quitosán inhiben la germinación de esporas y por lo tanto la formación de colonias a diferencia de usar solo quitosán, el cual únicamente retarda la germinación.

Por otra parte, esta acción sinérgica no se presentó con las dosis de $8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ lo que pudo ser resultado de la existencia de cepas mutantes inestables

Table 2.
Interaction between the combination of *T. parareesei* metabolites and chitosan doses on the growth efficiency of *F. oxysporum*

Tabla 2.
Interacción entre la combinación de metabolitos de *T. parareesei* y dosis de quitosán sobre la eficacia de crecimiento de *F. oxysporum*

Treatment	Synergistic factor	Interaction
<i>T. parareesei</i> metabolites (<i>Tp3</i> and chitosan $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Qs11))	0.81	Antagonistic
<i>T. parareesei</i> metabolites and chitosan ($4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1	Additive
<i>T. parareesei</i> metabolites and chitosan ($6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1.18	Synergistic
<i>T. parareesei</i> metabolites and chitosan ($8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.96	Antagonistic
<i>T. parareesei</i> metabolites and chitosan ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.84	Antagonistic
<i>T. parareesei</i> metabolites and chitosan ($12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1.1	Synergistic

showed different results. According to Abou *et al.* (2007), at doses higher than 3 and 4.5 mg • mL⁻¹ of chitosan, the occurrence of mutant strains of *T. harzianum* is promoted, however genetically unstable strains are more proliferative. This suggests that the stable mutants will express their antagonistic action on *F. oxysporum* with the proviso that action of the unstable mutants will not be predictable.

Conclusions

The dose of chitosan that reduced the area of growth of the phytopathogen was of 12 mg • mL⁻¹ and did not affect the growth of *Trichoderma* allowing the liberation of metabolites which occupied an area superior to 7.0 cm². Although this was not related to the reduction of *Fusarium* growth, the synergistic effect was observed between the doses 6 and 12 mg • mL⁻¹ and the metabolites diffused in the SDA medium. Information about the antagonistic, additive or synergistic action of the secondary metabolites of *Trichoderma* plus the effect of chitosan allow us to propose mixtures of these two agents, which will potentially generate a positive effect in the control of phytopathogenic fungi as *Fusarium*, since the behavior of both antagonists and the phytopathogen can be predicted, however, the effect of chitosan in the stimulation of the plant defensive system is one of the factors that is necessary to consider when applying these mixtures.

References

- Abou, S. N. A., Abd-El-Aal, S. K. H. and Saha, A. F. (2007). The Mutagenic Activity of Chitosan and its Effect on the Growth of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Sesami*. *Journal of Applied Sciences Research*, 3 (6): 450-455. <http://www.aensiweb.com/old/jasr/jasr/2007/450-455.pdf>
- Alfonso, C., Del Amo, F., Nuero, O. M. and Reyes, F. (1992). Physiological and biochemical studies on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 2 for its biocontrol by nonpathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 99(2-3): 169-174. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05561.x>
- Al-Hetar, M. I., Zainal, A. M. A., Sariah, M. and Mui-Yun, W. (2011) Antifungal Activity of Chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp *cubense*. *Journal of Applied Polymer Science*, 120 (4):2434-2439. <https://doi.org/10.1002/app.33455>
- Allan, R. C. & Hadwiger, L. A. (1979) The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Micologia experimental*, 3(3): 285-287. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147597579800547>
- Chittenden, C. & Singh, T. (2009) In vitro evaluation of combination of *Trichoderma harzianum* and chitosan for the control of sapstain fungi. *Biological Control*, 50 (3): 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.04.015>
- De Granada, E. G., Orozco De Amezcuita, M. C., Bautista Mendoza, G. R. and Valencia Zapata, H. A. (2001) . *Fusarium oxysporum* El Hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, 6 (1): 7-25. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/63462>
- Erayya, Shukla, N., Balodi, R., Tewari, A. K. and Kumar, J. (2018) Compatibility of *Trichoderma* with Copper-Chitosan Graded Combinations, *Plant Disease Research*, 35 (1): 2249-8788. <http://doi.org/10.5958/2249-8788.2020.00008.6>

las cuales mostraron resultados diferentes. De acuerdo a Abou *et al.* (2007) a dosis mayores a 3 y 4.5 mg • mL⁻¹ de quitosan se induce la existencia de cepas mutantes de *T. harzianum*, pero proliferan más aquellas que son genéticamente inestables. Esto sugiere que las mutantes estables expresarán su acción antagónica sobre *F. oxysporum* pero no resultará predecible la acción de las mutantes inestables.

Conclusiones

La dosis de quitosan que redujo el área de crecimiento del fitopatógeno fue de 12 mg • mL⁻¹, dicha dosis no afectó el crecimiento de *Trichoderma*, y permitió la liberación de metabolitos los cuales ocuparon un área superior a 7.0 cm², aunque esta no estuvo relacionada con la reducción de crecimiento de *Fusarium*, si se observó efecto sinérgico entre las dosis 6 y 12 mg • mL⁻¹ y los metabolitos difundidos en el medio SDA. El conocimiento de la acción antagónica, aditiva o sinérgica de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* más el efecto del quitosan permite proponer mezclas de éstos dos agentes, las cuales tendrán la certeza de generar un efecto positivo en el control de hongos fitopatógenos como *Fusarium*, ya que se conocerá el comportamiento tanto de antagonistas como del fitopatógeno, sin embargo, el efecto del quitosan en la estimulación del sistema de defensa de la planta es una de los factores que es necesario considerar al aplicar este tipo de mezclas.

- Guo, Z., Chen, R., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., Li, C. and Li, P. (2006). Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities in vitro. *Carbohydrate Research*, 34 (3): 351-354. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.11.002>
- Hermosa, R., Cardoza R. E., Rubio, M. B. and Gutiérrez, S. (2014) Chapter 10 - Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Trichoderma*. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 125-137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00010-2>
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños M. S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montevalvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M. and Bello-Pérez, L. A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73 (4): 541-547. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.020>
- Kowsari, M., Motallebi, M. and Zamani, M. (2014) Protein Engineering of Chit42 Towards Improvement of Chitinase and Antifungal Activities. *Curr Microbiology*, 68:495-502. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0494-3>
- Lárez V. C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *UDO Agrícola*, 8 (1): 1-22. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08002>
- Melia, S. & Aryantha, I. N. P (2010) The Effects of Chitosan on Antifungal Activity of *Trichoderma harzianum* Rifai against *Fusarium oxysporum*. The 2nd International Biotechnology & Biodiversity Conference (BIOJOHOR 2010), Malaysia. https://www.researchgate.net/publication/259335372_The_Effects_of_Chitosan_on_Antifungal_Activity_of_Trichoderma_harzianum_Rifai_against_Fusarium_oxysporum
- Palma-Guerrero, J., Jansson, H., Salinas, J. and Lopez-Llorca, J. V. (2008). Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of Plant. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (2): 541–553. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03567.x>
- Prapagdee, B., Kotchadat, K., Kumsopa, A. and Visarathanonth, N. (2007). The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. *Bioresour Technology*, 98 (7): 1353–1358. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.029>
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. I., Steurbaut, W. and Stevens, C. V. (2009). In vitro assessment of N-(benzyl) chitosan derivatives against some plant pathogenic bacteria and fungi. *European Polymmer Journal*, 45(1): 237-245. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.10.021>
- Roller, S. & Covill, N. (2000) The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. *Journal Food Protection*, 63 (2): 202-209. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10678425>
- Sandhya, C., Madhayan, K. N. and Pandey, A. (2005) Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8): 2689-2694. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>
- Singh, T., Vesentini, D., Singh, A. P. and Daniel, G. (2008). Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi. *International Biodeterioration & BiodegradationInt*, 62(2): 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.09.006>
- Xu, X. M., Jeffries, P., Pautasso, M. and Jeger, M. J. (2011). Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, 101(9):1024-1031. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-08-10-0216>