

Caracterización bioquímica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. endófitas en tomate con potencial de biocontrol de *Meloidogyne* spp.

Marisol Morel^{2*}, Socorro García², Yency Castillo², Marianela Conce², Juan de Dios Moya², Teófila Reinoso², Pedro Núñez² y Katherine Alonzo³

¹Investigación realizada en el marco del proyecto "Evaluación de cepas nativas del hongo endófito *Trichoderma* spp. en el control de *Meloidogyne* spp. en tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) bajo ambiente protegido", financiado por el FONDOCYT. ²Investigadores del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF). ³Alumno de término de Ingeniería Agronómica, Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD), *Autor para correspondencia: marisolmorel25@hotmail.com / solmarimorelr@gmail.com

RESUMEN

El hongo *Trichoderma* posee varios mecanismos de defensa contra los patógenos, entre los que se encuentran la producción de enzimas antifúngicas como son: la celulasa, quitinasa y pectinasa. Las enzimas producidas por *Trichoderma* actúan en la degradación de la pared celular de los patógenos, activan el proceso de micoparasitismo e inducen resistencia a las plantas. Esta investigación tuvo como objetivo caracterizar bioquímicamente cepas de *Trichoderma* endófitas en el cultivo de tomate. Se instalaron tres experimentos con 18 cepas de *Trichoderma* para determinar la presencia de las enzimas quitinasa, celulasa y pectinasa en los laboratorios de protección vegetal y suelo de la Estación Experimental Mata Larga del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf). En cada experimento se utilizaron las 18 cepas de *Trichoderma* con tres repeticiones más un control. Para determinar la enzima quitinasa se utilizó medio basal (MB) con quitina coloidal suplementado con bromocresol púrpura. La celulasa se determinó en medio agar de sal mineral Czapek suplementado con carboximetilcelulosa (CMC). La pectinasa, en medio agar pectinasa suplementado con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 1 %. A los cinco días se evaluó el color y diámetro formado por las cepas de *Trichoderma*. Las cepas de *Trichoderma* no presentaron actividad enzimática quitinasa a los 5 días de evaluadas. En el medio de cultivo suplementado con quitina coloidal para la detección de quitinasa se desarrolló la enzima proteasa. El 39 % de las cepas de *Trichoderma* presentó actividad enzimática celulasa y el 90 % de pectinasa, lo cual favorece el uso de esas cepas para el control biológico.

Palabras clave: Palabras claves: Hongos antagonistas, enzima, quitinasa, pectinasa, celulasa

ABSTRACT

The *Trichoderma* fungus has several defense mechanisms against pathogens, among which are the production of antifungal enzymes such as: cellulase, chitinase and pectinase. The enzymes produced by *Trichoderma* act in the degradation of the cell wall of pathogens, activate the process of mycoparasitism and induce resistance in plants. The objective of this research was to biochemically characterize endophytic *Trichoderma* strains in tomato crops. Three experiments with 18 *Trichoderma* strains were installed to determine the presence of chitinase, cellulase and pectinase enzymes in the plant protection and soil laboratories of the Mata Larga Experimental Station of the Dominican Institute of Agricultural and Forestry Research (Idiaf). In each experiment, the 18 *Trichoderma* strains were used with three repetitions plus a control. To determine the chitinase enzyme, basal medium (MB) was obtained with colloidal chitin supplemented with bromocresol purple. Cellulase is extended on Czapek mineral salt agar medium supplemented with carboxymethylcellulose (CMC). Pectinase, in

pectinase agar medium supplemented with 1% hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB). After five days, the color and diameter formed by the *Trichoderma* strains were evaluated. The *Trichoderma* strains did not present chitinase enzymatic activity 5 days after evaluation. In the culture medium supplemented with colloidal chitin for the arrest of chitinase, the protease enzyme was developed. 39 % of the biological strains of *Trichoderma* presented cellulase enzymatic activity and 90 % of pectinase, which favors the use of these strains for control.

Keywords: *Antagonist fungi, enzyme, chitinase, pectinase, cellulase*

INTRODUCCIÓN

Trichoderma spp. está considerado como un hongo antagonista, y las especies de este género se han caracterizado por su eficacia como agentes de biocontrol de diversas enfermedades de cultivos comerciales, Kamala & Indira 2011, León *et al.* 2018, Salazar *et al.* 2011, Villamil *et al.* 2014. Este género puede habitar en el suelo tanto de forma saprofita y/o parasitando otros hongos (Acurio y España 2017 y Chávez 2006), como de manera endófito en tejido vegetal, propiciándoles a los cultivos un aumento en el mecanismo de defensa contra los patógenos (Meneses 2003, León *et al.* 2018 y Waller *et al.* 2005). El hongo *Trichoderma* posee varios mecanismos de defensa contra los patógenos, entre los que se encuentran la producción de enzimas antifúngicas que sirven de señal para que los mecanismos de defensa de las plantas se activen, entre ellas se encuentran la celulasa, quitinasa y pectinasa, García-Espejo *et al.* 2016 y Medina 2016. Las enzimas producidas por *Trichoderma* actúan en la degradación de la pared celular de los patógenos, favorecen el desarrollo vegetativo de las plantas, activan el proceso de micoparasitismo y la inducción de resistencia en las plantas, González *et al.* 2012, Saba *et al.* 2012, Torres *et al.* 2008 y Zeilinger y Omann 2007.

Se ha caracterizado los componentes enzimáticos de *Trichoderma*, tanto de forma cualitativa como cuantitativa, mediante el uso del espectrofotómetro, García-Espejo *et al.* 2016, González *et al.* 2012 y Prasetyawan *et al.* 2018. González *et al.* (2010) evaluaron la inducción de la quitinasa de diez aislados de *Trichoderma* en tres medios de cultivo líquido, estos fueron: medio basal, medio basal suplementado con quitina y medio basal suplementado con gelatina; y determinaron que el medio suplementado con quitina resultó ser el más adecuado para estimular la inducción de quitinasa. Por otro lado, Prasetyawan *et al.* (2018), investigando la actividad de las enzimas glucanasa y quitinasa en algunos aislados de *Trichoderma* spp (L-1, L-2, Is-1, Is-2 e Is-7), reportaron que el aislado L-1 presentó la mayor actividad de quitinasa y glucanasa.

Conocer la actividad enzimática presente en las cepas nativas de *Trichoderma* spp. es importante, debido a que la presencia de enzimas como la quitinasa puede ayudar a reducir los huevos de nematodos y las agallas producidas por estos en las raíces, Hallmann *et al.* 1999 y Park *et al.* 2005. Las enzimas favorecen la capacidad de *Trichoderma* como agente de biocontrol.

En la literatura consultada sobre la caracterización bioquímicas de cepas de *Trichoderma* spp., no se encontró trabajos publicados en la República Dominicana, por lo que, este pudiera ser el primer reporte.

Esta investigación tuvo como objetivo caracterizar bioquímicamente cepas nativas de *Trichoderma* spp. que mostraron capacidad de colonización endófitas en el cultivo de tomate en casa malla, por lo que tienen potencial de biocontrol de *Meloidogyne* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del experimento

El experimento fue realizado durante el período febrero a junio del año 2021 en los laboratorios de protección vegetal y suelo de la Estación Experimental Mata Larga del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), en San Francisco de Macorís, provincia Duarte, República Dominicana.

Cepas de *Trichoderma* spp. utilizadas

Se evaluó la actividad bioquímica de 18 cepas de *Trichoderma* spp. que resultaron endófitas en tomate en ensayos previos a esta actividad (Tabla 1). Estas cepas estuvieron conservadas a -4 °C en glicerol al 30 %. Para reactivarlas, fueron sembradas en medio de cultivo Papa-Dextrosa Agar (PDA) en plato Petri, y se incubaron por 8 días a 28± 2 °C. Luego de reactivadas, se hicieron purificaciones para instalar los experimentos.

Tabla1. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. endófitas en tomate utilizadas en el experimento

Código de la cepa	Especie	Procedencia
PJ-1	<i>T. afroharzianum</i>	Moca
PJ-3	<i>T. harzianum</i>	
PJ-4	<i>T. harzianum</i>	
PJ-6	<i>T. cf. harzianum</i>	
PJ-7	<i>T. harzianum</i>	
VA-9	<i>T. asperellum</i>	
VA-10	<i>T. asperellum</i>	
VA-11	<i>Trichoderma</i> sp.	
VA-12	<i>T. asperellum</i>	
VA-13	<i>T. asperellum</i>	
VA-14	<i>Trichoderma</i> sp.	
VA-15	<i>Trichoderma</i> sp.	
NT-16	<i>Trichoderma</i> sp.	Salcedo
NT-17	<i>Trichoderma</i> sp.	
AL-20	<i>T. harzianum</i>	Moca
MH-23	<i>T. asperellum</i>	La Vega
IV-24	<i>Trichoderma</i> sp.	Salcedo
FV-25	<i>Trichoderma</i> sp.	

Leyenda: PJ-1 a PJ-7 (Porfirio Jiménez), VA-9 a VA- 15 (Vicente Abreu), NT-16 y 17 (Nando Tejada),

AL-20 (Antonio López), MH- 23 (Mario Hidalgo), IV-24 y FV-25 (Ideli Veras).

Manejo de la investigación

Se instalaron tres experimentos para determinar la presencia de las enzimas quitinasa, celulasa y pectinasa en las 18 cepas endófitas de *Trichoderma* spp. En cada experimento se utilizaron tres repeticiones más un control, el cual correspondió al medio de cultivo empleado en cada prueba sin el inóculo de *Trichoderma*. El medio de cultivo específico para cada enzima se preparó en 1000 ml de agua destilada, se midió el pH y se esterilizó por 15 minutos en autoclave a 121 °C. Luego se colocó 10 ml en placas Petri desechables 100 x 15 mm. Gelificado el medio de cultivo, fue inoculado con un disco de micelio de 2 mm de diámetro de cada cepa de *Trichoderma* de 5 días de cultivada en medio PDA, y luego se incubó a 25 ± 2 °C durante 5 días. En la Figura 1, se muestran secuencias de los experimentos.

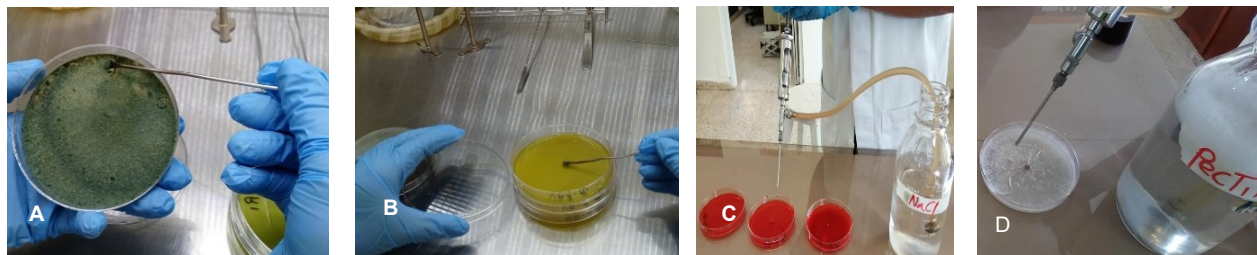


Figura 1. Procesos para determinar las enzimas quitinasa, celulasa y pectinasa en aislados de *Trichoderma*. A) toma de disco de *Trichoderma*, B) inoculación en el medio para quitinasa, C) aplicación NaCl a medio con rojo Congo para celulasa, D) aplicación de CTAB para pectinasa

Determinación de la actividad enzimática:

Determinación de quitinasa

La presencia de la quitinasa se determinó según metodología descrita por Kamala & Indira (2011) modificada. Se utilizó medio basal (MB) con quitina coloidal suplementado con bromocresol púrpura. Al medio de cultivo se le colocó la mitad del reactivo acid citric anhydrous y el pH se bajó a 4.21 para que se tornara de color amarillento, Figura 2, según la metodología descrita por Kamala & Indira (2011).

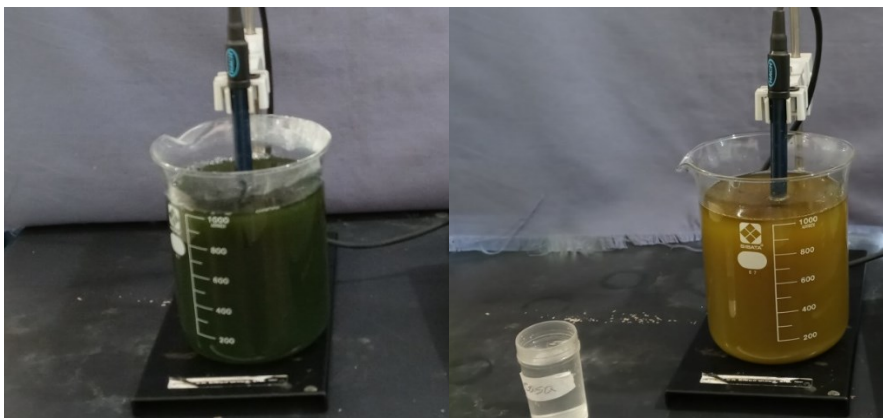


Figura 2. Determinación de pH del medio quitinasa: A) medio con pH 4.73; B) medio con pH 4.21

Determinación de celulasa

Para determinar la celulasa, las cepas de *Trichoderma* se sembraron en medio agar de sal mineral Czapek suplementado con carboximetilcelulosa (CMC), según metodología de Hankin y Anagnostakis (1975) citado por Cherkupally *et al.* (2017) modificada. El pH se ajustó a 5.01, las placas de Petri fueron incubadas por 5 días con el inóculo de las cepas de *Trichoderma*. Pasados los días de incubación, a cada placa Petri se le aplicó 6 ml de una solución de rojo Congo (al 0.1 %) durante 15 minutos, pasado este tiempo se descartó el rojo Congo de los platos y se le aplicó 6 ml del reactivo cloruro de sodio (NaCl a 1 M) durante 15 minutos.

Determinación de pectinasa

Para determinar la pectinasa, las cepas de *Trichoderma* se cultivaron en medio agar pectinasa, según metodología de Sudeep *et al.* (2020). El pH se ajustó en 5.10; las placas de Petri fueron incubadas por 5 días con el inóculo de las cepas de *Trichoderma*. Transcurridos los 5 días de incubación, cada placa Petri se cubrió con 6 ml del reactivo bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 1 % y se incubaron por segunda vez en la oscuridad por 24 horas.

Variables evaluadas

Se evaluó el color como indicador para determinar la actividad enzimática quitinasa, pectinasa y celulasa de *Trichoderma* spp en medios de cultivos específicos. También, se evaluó el diámetro para medir el desarrollo enzimático formado alrededor de los discos de *Trichoderma* spp. inoculados en el medio de cultivo específico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad enzimática:

Determinación de quitinasa

Las 18 cepas de *Trichoderma* desarrollaron colonias de color azul alrededor del disco de *Trichoderma* (Figura 3). Ese color está presente por lo general en la actividad enzimática de la proteasa (Cherkupally *et al.*, 2017), enzima que según Delgado *et al.* (2001) participa en la degradación de los lípidos y proteínas que forman la cutícula de los insectos. En el medio con quitina coloidal debió desarrollarse el color violeta o morado alrededor del inóculo, el cual es el indicativo de la presencia de la actividad quitinasa (García-Espejo 2016), tal como lo reportado por Lunge y Patil (2012) en la caracterización de la enzima quitinolítica de tres especies de *Trichoderma*, en donde se presentó formación de la zona de color morado en las tres especies evaluadas; pero no ocurrió así. Por lo que, según estas referencias, en las cepas evaluadas en esta investigación no está presente la enzima quitinasa.

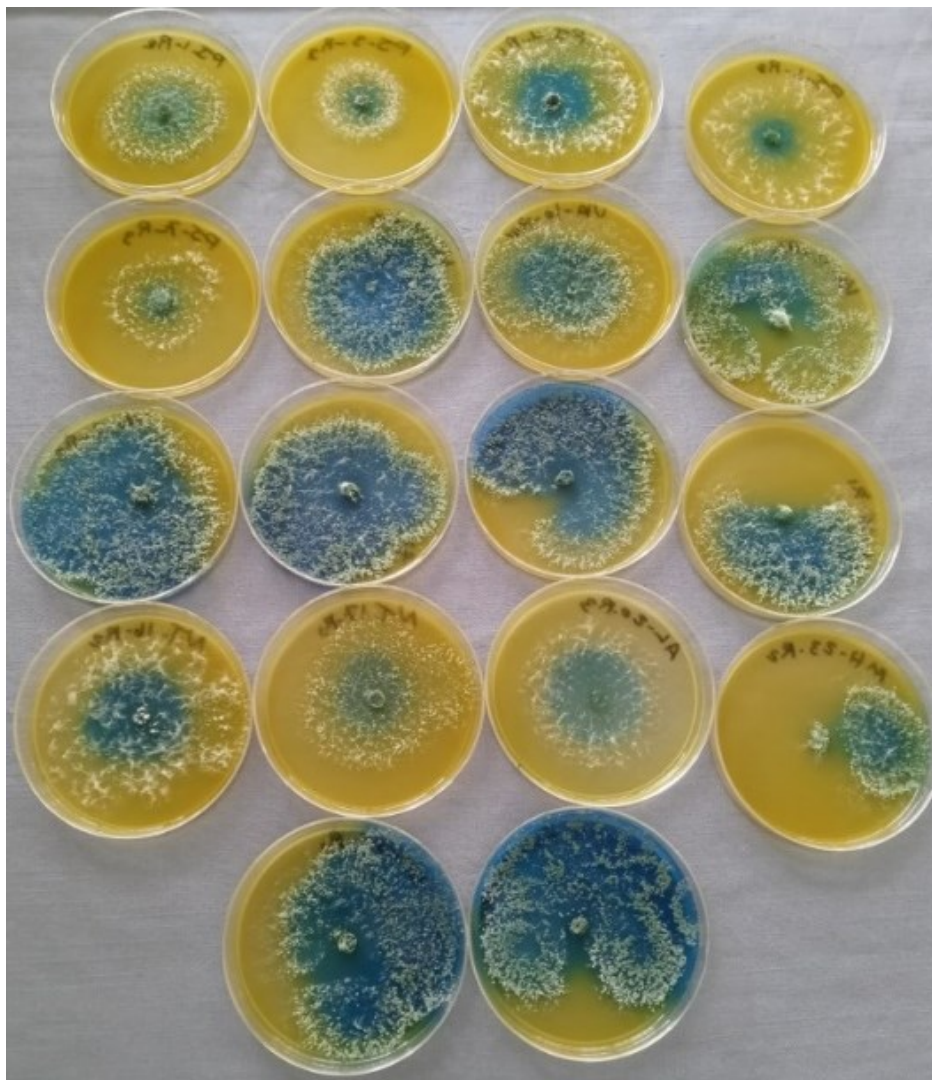


Figura 3. *Trichoderma* spp., en medio de cultivo quitinasa

Aunque en el medio con quitina coloidal no se desarrolló el color violeta característico de la quitinosa, si se pudo evidenciar la presencia de la actividad enzimática proteasa. El diámetro de crecimiento de las colonias de *Trichoderma* varió según la cepa. Tres cepas presentaron los promedios más altos: FV-25 (*Trichoderma* sp.), con 6.33 cm; VA-12 (*T. asperellum*) y VA-13 (*T. asperellum*), ambas con 5.03 cm, Tabla 2. Las demás cepas tuvieron diámetros entre 0.87 y 4.33 cm. Los resultados de la actividad enzimática encontrados en esta investigación son inferiores a lo reportado por Kamala & Indira (2011), en cuyos promedios del diámetro de la zona alrededor de la colonia rondaron los 8.13 cm.

Tabla 2. Promedio del diámetro de la colonia de *Trichoderma* spp formada en el medio quitinasa

Cepas evaluadas	Especie de <i>Trichoderma</i>	Diámetro colonia (cm)
PJ-1	<i>T. afroharzianum</i>	2.07
PJ-3	<i>T. harzianum</i>	0.87
PJ-4	<i>T. harzianum</i>	2.30
PJ-6	<i>T. cf. harzianum</i>	1.10
PJ-7	<i>T. harzianum</i>	0.90
VA-9	<i>T. asperellum</i>	4.33
VA-10	<i>T. asperellum</i>	3.30
VA-11	<i>Trichoderma</i> sp.	1.03
VA-12	<i>T. asperellum</i>	5.03
VA-13	<i>T. asperellum</i>	5.03
VA-14	<i>Trichoderma</i> sp.	1.30
VA-15	<i>Trichoderma</i> sp.	1.47
NT-16	<i>Trichoderma</i> sp.	2.93
NT-17	<i>Trichoderma</i> sp.	1.73
AL-20	<i>T. harzianum</i>	2.00
MH-23	<i>T. asperellum</i>	3.67
IV-24	<i>Trichoderma</i> sp.	3.27
FV-25	<i>Trichoderma</i> sp.	6.33
Control	Sin inóculo	0.00

Determinación de celulasa

De las 18 cepas de *Trichoderma* evaluadas, siete presentaron actividad enzimática de celulasa, visualizándose un área de color amarillo opaco, mientras que 11 cepas se comportaron similar al tratamiento control sin el inóculo de *Trichoderma*, Figura 4. De las siete cepas que resultaron con actividad enzimática, los promedios más altos del diámetro de las colonias se presentaron en las cepas (PJ-1) *T. afroharzianum*, con 7.57 cm; (PJ-7) *T. harzianum*, con 7.53 cm y (PJ-4) *T. harzianum*, con 7.33 cm (Tabla 3). Estos resultados fueron superiores a lo reportado por Guruk y Karaaslan (2020), en la caracterización bioquímica de la enzima celulasa de cinco cepas de *Trichoderma* aisladas del suelo, en donde el diámetro presentado en la actividad enzimática fue de 4.2 a 2.6 cm.

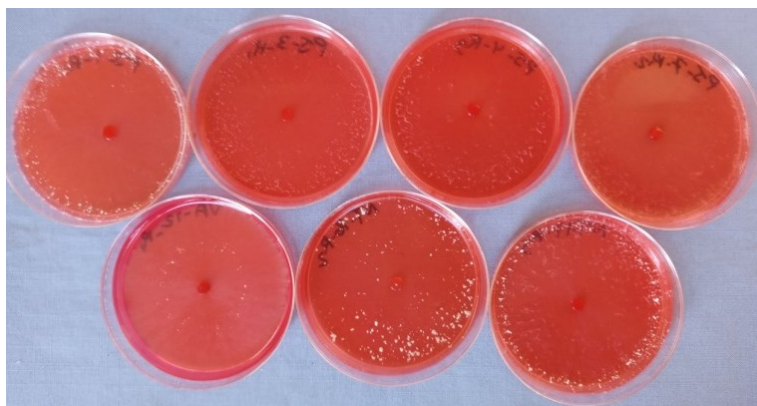
Figura 4. Cepas de *Trichoderma* con presencia enzimática en medio celulasa

Tabla 3. Promedio del diámetro de la colonia de *Trichoderma* spp formada en el medio celulasa

Cepas evaluadas	Especie de <i>Trichoderma</i>	Diámetro colonia (cm)
PJ-1	<i>T. afroharzianum</i>	7.57
PJ-3	<i>T. harzianum</i>	7.00
PJ-4	<i>T. harzianum</i>	7.33
PJ-6	<i>T. cf. harzianum</i>	0.00
PJ-7	<i>T. harzianum</i>	7.53
VA-9	<i>T. asperellum</i>	0.00
VA-10	<i>T. asperellum</i>	0.00
VA-11	<i>Trichoderma</i> sp.	0.00
VA-12	<i>T. asperellum</i>	1.67
VA-13	<i>T. asperellum</i>	0.00
VA-14	<i>Trichoderma</i> sp.	0.00
VA-15	<i>Trichoderma</i> sp.	0.00
NT-16	<i>Trichoderma</i> sp.	6.67
NT-17	<i>Trichoderma</i> sp.	7.00
AL-20	<i>T. harzianum</i>	0.00
MH-23	<i>T. asperellum</i>	0.00
IV-24	<i>Trichoderma</i> sp.	0.00
FV-25	<i>Trichoderma</i> sp.	0.00
Control	Sin inóculo	0.00

Determinación de pectinasa

De las 18 cepas de *Trichoderma* evaluadas, 17 presentaron formación de zona clara (hidrólisis) alrededor de las colonias a las 24 horas de tratadas con el reactivo CTAB (Figura 5). Resultados similares reportó Amilia *et al.* (2017) evaluando la actividad pectinolítica de 15 aislados de hongos entre ellos *Trichoderma*, en donde 8 aislados presentaron formación de zona clara alrededor de las colonias a las 48 horas de tratadas con el reactivo CTAB. En la presente investigación las cepas que presentaron los promedios más altos fueron (PJ-4) *T. harzianum*, con 6.93 cm; (PJ-3) *T. harzianum*, con 6.67 cm; (PJ-7) *T. harzianum* y (NT-16) *Trichoderma* sp. ambas con 6.50 cm. Mientras que la cepa (FV-25) *Trichoderma* sp. presentó el promedio más bajo, con 1.67 cm, y la cepa (AL-20) *T. harzianum* no presentó actividad pectinasa (Tabla 4).

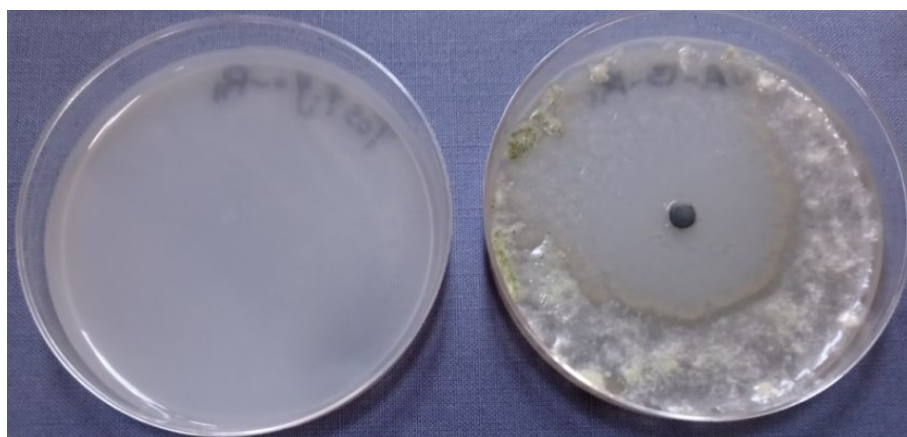


Figura 5. Ensayo pectinasa A) control sin inóculo: B) medio de cultivo inoculado con una de las cepas de *Trichoderma* spp.

Tabla 4. Promedio del diámetro de las colonias de *Trichoderma* spp., formada en el medio pectinasa

Cepas evaluadas	Especie de <i>Trichoderma</i>	Diámetro colonia (cm)
PJ-1	<i>T. afroharzianum</i>	4.33
PJ-3	<i>T. harzianum</i>	6.67
PJ-4	<i>T. harzianum</i>	6.93
PJ-6	<i>T. cf. harzianum</i>	2.17
PJ-7	<i>T. harzianum</i>	6.50
VA-9	<i>T. asperellum</i>	4.77
VA-10	<i>T. asperellum</i>	5.17
VA-11	<i>Trichoderma</i> sp.	5.50
VA-12	<i>T. asperellum</i>	4.17
VA-13	<i>T. asperellum</i>	3.50
VA-14	<i>Trichoderma</i> sp.	4.83
VA-15	<i>Trichoderma</i> sp.	4.97
NT-16	<i>Trichoderma</i> sp.	6.50
NT-17	<i>Trichoderma</i> sp.	4.50
AL-20	<i>T. harzianum</i>	0.00
MH-23	<i>T. asperellum</i>	3.37
IV-24	<i>Trichoderma</i> sp.	5.50
FV-25	<i>Trichoderma</i> sp.	1.67
Control	Sin inóculo	0.00

CONCLUSIONES

- Las cepas de *Trichoderma* no presentaron actividad enzimática quitinasa a los 5 días de evaluadas.
- En el medio de cultivo suplementado con quitina coloidal para la detención de quitinasa se desarrolló la enzima proteasa.
- El 39 % de las cepas de *Trichoderma* presentó actividad enzimática celulasa; y el 90 % de pectinasa, lo cual favorece el uso de esas cepas para el control biológico.

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (Mescyt), a través del Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondocyt) por el financiamiento del proyecto “Evaluación de cepas nativas del hongo endófito *Trichoderma* spp. en el control de *Meloidogyne* spp. en tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) bajo ambiente protegido”

Al señor Welinton Cuello, por su colaboración en los análisis de pH realizados a los medios de cultivos en cada prueba.

A la ingeniero agrónomo Nelsida Martínez y a la estudiante de agronomía Altagracia Ureña, por su colaboración en las evaluaciones de los ensayos.

LITERATURA CITADA

Acurio, R.; España, C. 2017. Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma* spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 25(1):53-61.

Amilia, K.; Sari, S.; Setyaningsih, R. 2017. Isolation and Screening of Pectinolytic Fungi from Orange (*Citrus nobilis* Tan.) and Banana (*Musa acuminata* L.) Fruit Peel. International Conference On Food Science and Engineering. IOP Publishing.

Chávez, M. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y Evaluación de su efecto en cultivo de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) Tesis de grado en: Microbiología Industrial – Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, CO. 113 p.

Cherkupally, R.; Amballa, H.; Narasimha, B. 2017. *In vitro* screening for enzymatic activity of *Trichoderma* species for biocontrol potential. Annals of Plant Sciences 6(11): 1784-1789.

Delgado, B.; López, F.; Giraldo, C. 2001. Actividad enzimática de hongos y su patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 60: 43-49.

García-Espejo, C.; Mamani-Mamani, M.; Chávez-Lizárraga, G.; Álvarez-Aliaga, M. 2016. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible Biocontrolador. Journal of the Selva Andina Research Society 7(1):20-32.

González, I.; Infante, D.; Peteira B.; Martínez B.; Arias, Y.; González, N.; Miranda, II. 2010. Caracterización Bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. Promisarios como agentes de control Biológico. I. Expresión de actividad quitinasa. Rev. Protección Veg. 25 (1): 58-63.

González, I.; Infante, D.; Martínez, B.; Arias, Y.; González, N.; Miranda, II.; Peteira B. 2012. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. Biotecnología Aplicada. 29 (1):7-11.

- Guruk, M.; Karaaslan, M. 2020. Production and Biochemical Characterization of Cellulase Enzyme by *Trichoderma* Strains from Harran Plain. International Journal of Life Sciences and Biotechnology. 3(3): 258-274.
- Hallmann, J., Rodríguez-Kábana R., Kloepper, J. 1999. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. Soil Biology and Biochemistry 31(4): 551-560.
- Kamala, T.; Indira S. 2011. Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. Springer, 3 Biotech 1:217–225.
- León, T.; Ortiz, C.; Condori, T.; Chura, Y. 2018. Cepas de *Trichoderma* con capacidad endofítica sobre el control del mildiu (*Peronospora variabilis* Gäum.) y mejora del rendimiento de quinua. Revista de Investigaciones Altoandinas 20(1): 19-30.
- Lunge, A.; Patil, A. 2012. Characterization of efficient chitinolytic enzyme producing *Trichoderma* species: a tool for better antagonistic approach. International Journal of Science, Environment and Technology. 5(1): 377-385 p.
- Medina, F. 2016. Mecanismos de protección de *Trichoderma* sp. y patogenesis de *Fusarium oxysporum* en el Nardo (*Polianthes tuberosa*). Tesis: Maestro en Ciencias de la Floricultura. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco a. C. Guadalajara, Jalisco, MX. 97 p.
- Meneses, A. 2003. Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* Cobb, Thorne. Tesis para optar por el título de Master en ciencias. CATIE. Turrialba, CR. 89 p.
- Park, R.; Kim, K.; Kim, Y.; De Jin, R.; Krishnan, H.; Suh, J. 2005. Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Nematology 7(1): 125-132.
- Prasetyawan, S.; Sulistyowati, L. 2018. Glucanase and Chitinase from Some Isolates of Endophytic Fungus *Trichoderma* spp. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 7 p.
- Saba, H.; Vibhash, D.; Manisha, M.; Prashant, K.; Farhan, H.; Tauseef A. 2012. *Trichoderma* a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. Mycosphere 3(4): 524-531.
- Salazar, L.; Sanabria, N.; Aponte, G.; Alcano, M.; Herrera, R.; Colmenares, D.; Espinoza, M.; Alemán, L.; Magaña, S. 2011. Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Bioagro 23(3): 185-190.
- Sudeep, K.; Upadhyaya, J.; Raj, D.; Lekhak, B.; Kumar, D.; Raj, B.; Raj, T.; Dhital, R.; Khanal, S.; Koirala N.; Raghavan, V. 2020. Production, Characterization, and Industrial Application of Pectinase Enzyme Isolated from Fungal Strains. Article Fermentation 6(59): 2-10.
- Torres, E.; Iannaccone, J.; Gómez, H. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. Bragantia Campinas. 67(1): 169-178.
- Villamil, J.; Viteri, S.; Villegas, W. 2014. Aplicación de Antagonistas Microbianos para el Control Biológico de *Moniliophthora roreri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. Bajo Condiciones de Campo. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 68(1): 7441-7450.
- Waller, F.; Achatz, B.; Baltruschat, H.; Fodor, J.; Becker, K.; Fischer, M.; Heier, T.; Hückelhoven, R.; Neumann, C.; Wettstein, D.; Franken, P.; Kogel, K. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. PNAS 102 (38): 13386-13391.
- Zeilinger, S.; Omann M. 2007. *Trichoderma* biocontrol: Signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. Gene Regulation and Systems Biology (1): 227–234.

