

Evaluación del potencial biocontrolador de cepas de *Trichoderma* spp. nativas en suelos agrícolas de Pamplona, Norte de Santander

Darcy Daimar Toloza Jiménez

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Departamento de Microbiología

Pamplona, Colombia

2024

Evaluación del potencial biocontrolador de cepas de *Trichoderma* spp. nativas en suelos agrícolas de Pamplona, Norte de Santander

Darcy Daimar Toloza Jiménez

Trabajo de grado
Presentado como requisito para optar al título de

Microbiólogo

Directora
Ángela Maritza Cajiao Pedraza, MSc.

Codirector
Ramón Ovidio García Rico, PhD

Línea de investigación: Microbiología ambiental y agrícola

Grupo de investigación: GIMBIO

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Departamento de Microbiología

Pamplona, Colombia

2024

Dedicatoria

Dedico los esfuerzos de la realización de este trabajo a mis padres, hermano y demás familiares por contribuir tanto en mi formación personal como profesional, por enseñarme a encontrar dentro de la adversidad mi propia fuerza de voluntad.

A la maestra Angela Cajiao, por brindarme esta oportunidad, por su confianza, paciencia, comprensión y disposición.

"En realidad, solo existe la dirección que tomamos, lo que puede haber sido ya no vale"

"Somos una casualidad llena de intención"

-Mario Benedetti

Agradecimientos

Doy infinitas gracias a Dios por otorgarme salud y entendimiento, a él agradezco permitirme contar con el apoyo incondicional de mis padres, Nancy Jiménez Medina y Martin Toloza Saavedra, quienes con sus historias de vida han motivado y guiado cada uno de mis pasos, brindándome las herramientas necesarias para formarme con una persona íntegra, resolutiva y disciplinada. Hago especial reconocimiento a aquellos que siempre han estado presentes en mi crianza y formación, mi nona Beatriz Medina, Gerson Jiménez y Sonia Jiménez.

Agradezco a las futuras colegas y amigas por elección que tuve la fortuna de descubrir al iniciar este proceso formativo, por hacer de él una experiencia amena, colmada de mil anécdotas. Gracias por su acompañamiento y recomendaciones a los integrantes de GIMBIO, por concederme el honor de formar parte del grupo y hacer de este un espacio creativo y cálido.

Mi gratitud para aquellos maestros del programa que con su vocación por educar consiguieron impartir su sabiduría, siguiendo en mi concepto el pensamiento de Albert Einstein "*El arte más importante de un maestro es saber despertar en sus alumnos la alegría de conocer y crear",* permitiéndome así argumentar el cuestionamiento sobre el por qué por azar del destino decidí ser Microbióloga.

Tabla de contenido

Resumen 13

Abstract 14

Introducción 15

Justificación 17

Objetivos 19

Objetivo general 19

Objetivos específicos 19

Marco referencial 20

Antecedentes regionales 20

Antecedentes nacionales 23

Antecedentes internacionales 25

Marco conceptual 27

Trichoderma spp., un hongo polifacético 27

Clasificación taxonómica 27

Cultivo *in-vitro* 28

Descripción morfológica 29

Macroscópicamente 29

Microscópicamente 29

Trichoderma spp., perfil bioquímico 31

Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. 32

Acción directa 33

Antibiosis. 33

Competencia. 33

Micoparasitismo. 33

Acción Indirecta 34

Resistencia inducida. 34

Solubilización y secuestro de nutrientes. 35

Marco legal 36

Metodología 38

Colección de aislados agrícolas 38

Caracterización fenotípica 38

Observaciones morfológicas 38

Ecofisiología 39

Caracterización factores de virulencia y servicios ecosistémicos 40

Glucanasas 40

Celulasas 40

Proteasas 41

Amilasas 41

Amonificación 41

Nitrificación 42

Actividad antagónica *in-vitro* frente a *Fusarium* spp. y *Botrytis* spp. 42

Identificación de estrategias de micoparasitismo 43

Estimación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) 43

Determinación del grado de invasión 43

Análisis estadístico 44

Resultados y análisis 45
Caracterización fenotípica 45
Observaciones morfológicas 45
Ecofisiología 56
Efecto del pH sobre el desarrollo de *Trichoderma* spp. 56
Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de *Trichoderma* spp. 61
Caracterización factores de virulencia y servicios ecosistémicos 67
Actividad antagónica *in-vitro* frente a *Fusarium* spp. y *Botrytis* spp. 71
Antagonismo *in-vitro* frente a *Fusarium* spp. 72
Estimación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de *Fusarium* spp. 84
Antagonismo *in-vitro* frente a *Botrytis* spp. 86
Estimación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de *Botrytis* spp. 95
Determinación del grado de invasión 97
Conclusiones 100
Recomendaciones 101
Referencias 102
Apéndices 120

Listado de tablas

Tabla 1. Taxonomía de *Trichoderma* spp. 28

Tabla 2. Rangos de capacidad antagónica y asignación del poder biocontrolador. 44

Tabla 3. Velocidad de crecimiento radial (VCR). 56

Tabla 4. Actividad enzimática registrada por las cepas. 69

Tabla 5. Relación VCR estimadas con *Fusarium* spp. 81

Tabla 6. Relación VCR estimadas con *Botrytis* spp. 93

Tabla 7. Potencial antagónico de las cepas evaluadas frente a los fitopatógenos. 97

Listado de figuras

Figura 1. Morfología *Trichoderma harzianum*. 30

Figura 2. Morfología *Trichoderma pyramidale*. 31

Figura 3. Accionar de *Trichoderma* spp. frente a patógenos y promotor de crecimiento vegetal. 32

Figura 4. Accionar del micoparasitismo de *Trichoderma* spp. sobre hongos patógenos. 34

Figura 5. Georreferenciación de zonas muestreadas para los aislamientos evaluados. 38

Figura 6. Morfología característica del aislado *Th2*. 47

Figura 7. Morfología característica del aislado *Th4*. 48

Figura 8. Morfología característica del aislado *Th5*. 49

Figura 9. Morfología característica del aislado *Th12*. 51

Figura 10. Morfología característica del aislado *Th14*. 52

Figura 11. Morfología característica del aislado *Th19*. 54

Figura 12. Desarrollo micelial de las cepas bajo la influencia del pH. 57

Figura 13. Efecto del pH en el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. 59

Figura 14. Desarrollo micelial de las cepas en las temperaturas evaluadas. 62

Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la producción de pigmento por *Th19*. 63

Figura 16. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Trichoderma* spp. 64

Figura 17. Prueba para la detección cualitativa de glucanasas. 68

Figura 18. Ensayo antagónico, *Th2* contra *Fusarium* spp. 73

Figura 19. Ensayo antagónico, *Th4* contra *Fusarium* spp. 74

Figura 20. Ensayo antagónico, *Th5* contra *Fusarium* spp. 75

Figura 21. Ensayo antagónico, *Th12* contra *Fusarium* spp. 76

Figura 22. Ensayo antagónico, *Th14* contra *Fusarium* spp. 78

Figura 23. Ensayo antagónico, *Th19* contra *Fusarium* spp. 79

Figura 24. Crecimiento radial diario en cultivos duales con *Fusarium* spp. 82

Figura 25. PICR de *Fusarium* spp. conseguido por las cepas de *Trichoderma* spp. 84

Figura 26. Ensayo antagónico, *Th2* contra *Botrytis* spp. 87

Figura 27. Ensayo antagónico, *Th4* contra *Botrytis* spp. 88

Figura 28. Ensayo antagónico, *Th5* contra *Botrytis* spp. 89

Figura 29. Ensayo antagónico, *Th12* contra *Botrytis* spp. 90

Figura 30. Ensayo antagónico, *Th14* contra *Botrytis* spp. 91

Figura 31. Ensayo antagónico, *Th19* contra *Botrytis* spp. 92

Figura 32. Crecimiento radial diario en cultivos duales con *Botrytis* spp. 94

Figura 33. PICR de *Botrytis* spp. conseguido por las cepas de *Trichoderma* spp. 96

Listado de apéndices

Apéndice A. Composición medios de cultivo 120

Apéndice B. Seguimiento caracterización fenotípica 121

Apéndice C. Caracterización macroscópica y microscópica 124

Apéndice D. Identificación preliminar a nivel de especie 130

Apéndice E. Mediciones diarias del crecimiento radial 131

Apéndice F. Crecimiento diametral de *Trichoderma* spp. en la escala de pH 133

Apéndice G. Crecimiento diametral de *Trichoderma* spp. a diferentes temperaturas 135

Apéndice H. Caracterización factores de virulencia y servicios ecosistémicos 137

Apéndice I. Características macro y microscópica de los HFP ensayados 142

Apéndice J. Cronograma 148

Apéndice K. Presentación en eventos de divulgación científica 149

Abreviaturas

ACB: Agente de control biológico.

AES: Agar Extracto de suelo.

AEβ-G: Agar Extracto de β-glucanos.

CMC: Carboximetilcelulosa.

CMD: Agar harina de maíz y dextrosa.

CR: Crecimiento Radial.

CRF: Crecimiento radial fitopatógeno.

DC: Diámetro de crecimiento.

HFP: Hongo Fitopatógeno.

ICA: Instituto Colombiano Agropecuario.

LSD: Diferencia Mínima Significativa

ODS: Objetivo de Desarrollo Sostenible.

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

PDA: Agar Patata Dextrosa.

PICR: Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial.

RSI: Resistencia Sistémica Inducida.

SNA: Agar Nutriente Sintético.

VCR: Velocidad de Crecimiento Radial.

WBA: Agar salvado de trigo.

Resumen

La eficacia en el control de fitopatógenos por parte de diversas especies de *Trichoderma* spp. ha sido notoria durante un largo periodo de tiempo, distinción otorgada a causa de su habilidad para contrarrestar la severidad de las afecciones en tejidos vegetales, esencialmente mediante la capacidad antagónica y estrategias de parasitismo descritas, que, junto a la promoción del crecimiento vegetal e inducción de resistencia local o sistémica permiten categorizar al género como un potente biocontrolador frente a un amplio espectro de organismos, destacando particularmente su aplicabilidad contra hongos fitopatógenos. En virtud de estas aptitudes, se optó por evaluar el potencial biocontrolador de cepas agrícolas del género *Trichoderma* nativas de Pamplona (N. de S.), frente a hongos fitopatógenos de interés agronómico y comercial (*Fusarium* spp. y *Botrytis* spp.); bajo la finalidad de responder a las necesidades agrícolas de la región, se realizó la caracterización fenotípica de seis aislados de origen agrícola, sometiéndolos además a ensayos de caracterización ecofisiológica, factores de virulencia y pruebas de actividad antagónica *in-vitro*.

Las cepas nativas de *Trichoderma* spp. evidenciaron tener potencial antagónico frente a los hongos fitopatógenos ensayados a través de estrategias de micoparasitismo, competencia por nutrientes y actividad enzimática propia de los aislados como mecanismos de acción, registrando valores de PICR máximos de 64,5 % y 64,2 % para *Fusarium* spp. y *Botrytis* spp. respectivamente, resultados que permiten inferir de manera preliminar el potencial de los aislados como una posible medida de biocontrol sustentable y sostenible.

Palabras clave: Antagonista, biocontrol, fitopatógeno, micoparasitismo, *Trichoderma*.

Abstract

The efficacy in the control of phytopathogens by diverse species of *Trichoderma* spp. has been notorious for a long period of time, distinction granted because of its ability to counteract the severity of the affections in plant tissues, essentially by means of the antagonistic capacity and strategies of parasitism described, which, together with the promotion of plant growth and induction of local or systemic resistance allow categorizing the genus as a powerful biocontroller against a wide spectrum of organisms, emphasizing particularly its applicability against phytopathogenic fungi. In virtue of these aptitudes, it was decided to evaluate the biocontrol potential of agricultural strains of the genus *Trichoderma* native to Pamplona (N. de S.), against phytopathogenic fungi of agronomic and commercial interest (*Fusarium* spp. and *Botrytis* spp.); under the purpose of responding to the agricultural needs of the region, the phenotypic characterization of six isolates of agricultural origin was carried out, subjecting them to ecophysiological characterization tests, virulence factors and *in-vitro* antagonistic activity tests.

The native strains of *Trichoderma* spp. showed antagonistic potential against the tested phytopathogenic fungi through strategies of mycoparasitism, competition for nutrients and enzymatic activity of the isolates as mechanisms of action, registering maximum PICR values of 64.5 % and 64.2 % for *Fusarium* spp. and *Botrytis* spp. respectively, results that allow preliminary inference of the potential of the isolates as a possible measure of sustainable and sustainable biocontrol.

Key words: Antagonist, biocontrol, phytopathogen, mycoparasitism, *Trichoderma*.

Introducción

Trichoderma, un género de hongos filamentosos perteneciente a la división de los ascomicetos, ha cobrado importancia dentro del sector agrícola derivado del fuerte potencial para mejorar sus rendimientos, interviniendo favorablemente en diversas dificultades que comúnmente aquejan a la agricultura como mermas en la productividad agrícola y reducción de la fertilidad en los suelos. El valor que se le ha dado a dicho género surge de las capacidades biológicas descritas en infinidad de estudios realizados, en donde, cepas de *Trichoderma* spp., han superado desafíos como la biorremediación de compuestos perjudiciales, bioprotección y biocontrol; lo anterior debido a que la ubicuidad del moho y la adaptación a variadas condiciones climáticas le permiten ajustar su metabolismo para poder actuar en dichos bioprocesos, implicando además su rápido crecimiento, motivo por el que puede catalogarse como un notable competidor dentro de su ecosistema (A. K. Sharma & Sharma, 2020).

Recientemente, se han divulgado numerosas investigaciones relacionas con el efecto que tendrían las cepas de este hongo de ser considerada su aplicación en el campo, destacando en cada una de ellas especialmente el impacto del control biológico frente a un amplio espectro de organismos, incluyendo además su actividad sobre nemátodos. La eficacia aparente en el control y prevención de fitopatologías es relacionada con la facilidad de reproducción de las especies de *Trichoderma* spp., alcanzando un mejor desarrollo en la rizosfera, donde, la interacción con las raíces de las plantas les provee nutrientes y alterno a esto el hongo le ofrece beneficios al promover la germinación de semillas y engrosamiento de las raíces, mejorando la absorción de nutrientes, así como la inducción de mecanismo de resistencia frente a patógenos de interés agronómico; reemplazando de esta forma compuestos químicos, al encajar con el blanco de acción de la mayoría de ellos, permitiéndole al género actuar como posible fungicida, pesticida, plaguicida, insecticida

y a su vez como biofertilizante (Manoharachary *et al*., 2020). En este sentido, conociendo las capacidades del género y los multipropósitos que este puede llegar a cumplir, la presente investigación surge de la necesidad de aportar información experimental que a largo plazo permita el desarrollo de estrategias ecológicas e innovadoras favorables para el avance de la agricultura en la región, teniendo como finalidad evaluar el potencial de cepas nativas del género *Trichoderma* para biocontrolar *Fusarium* spp. y *Botrytis* spp., ambos patógenos de interés agrícola.

Justificación

La seguridad alimentaria es un término contemplado dentro del segundo Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) establecido por la organización de las naciones unidas (ONU), Hambre Cero, cuya meta es garantizar un abastecimiento equitativo de alimentos para toda la población (ONU, s. f.). Particularmente para su consecución, algunas de sus metas hacen énfasis en explorar estrategias ecológicas que favorezcan la mejora de la producción agrícola. En el panorama nacional, se estima que la mayor parte de los alimentos consumidos por los colombianos son producidos en el campo gracias al trabajo de agricultores, quienes logran abastecer la demanda de frutas, hortalizas y tubérculos de la población; de acuerdo con el Ministerio de Agricultura (2016), cerca del 70 % de estos productos son cultivados por pequeños agricultores, valor relacionado con la gran disposición de zonas dedicadas al cultivo y a los atributos geográficos del país. Lo anterior, permite indicar que Colombia centra uno de sus pilares económicos en la agricultura, por lo que se hace necesario el desarrollo de estrategias encaminadas a mejorar los sistemas de producción agrícola que contribuyan además al cumplimiento del ODS antes mencionado, comenzando para ello con la intensificación del rendimiento en dicha actividad incluso a pequeña escala, estrategias actuales que sean útiles para la mayor parte de las necesidades del sector. No obstante, habitualmente el logro de este propósito se ve interrumpido debido a que en ocasiones el rendimiento de las plantaciones disminuye considerablemente, esto como resultado de la invasión por parte de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, responsables a grandes rasgos de la marchites y pudrición del tejido vegetal infectado (Amaro *et al*., 2021), generando descensos en el rendimiento y calidad de los cultivos, ocasionando así mismo pérdidas económicas significativas; este desafío puede superarse mediante el aprovechamiento de recursos biológicos, útiles para el desarrollo de bioinsumos que mitiguen las

pérdidas del sector, así como los riesgos para la salud y el medioambiente que supone el uso frecuente e indiscriminado de agroquímicos, considerando que muchos de ellos se bioacumulan en nuestro entorno y dentro del organismo, llegando incluso a generar a largo plazo complicaciones de salud a las personas que se someten a una mayor exposición (agricultores), destacando el posible desarrollo de cáncer de hígado y testicular en hombres, o la predisposición a abortos espontáneos y valores hormonales atípicos en mujeres, todo asociado a los pesticidas (Borchers *et al.*, 2010).

En contraste, en las últimas décadas se ha optado por reunir esfuerzos para mitigar estos riesgos, específicamente mediante el estudio, desarrollo e implementación de bioinsumos que promuevan el cambio paulatino hacia una agricultura sustentable; un ejemplo de estos son los bioplaguicidas formulados a base de microorganismos antagonistas. Bajo esta premisa se ha indagado vigorosamente el género *Trichoderma*, destacado a nivel agrícola, puesto que la mayoría de sus especies tienen la facultad de producir múltiples enzimas que les permiten actuar como biocontrolador frente a un amplio espectro de organismos fitopatógenos. En donde, además de prevenir ciertas fitopatologías, *Trichoderma* spp. logra intervenir en la promoción del crecimiento de los cultivos agrícolas al facilitar la absorción de nutrientes, otorgando resistencia a la planta y consiguiendo la descontaminación de ecosistemas causada por agroquímicos persistentes (Yao *et al.*, 2023). Por tal motivo, el planteamiento de esta investigación busca con la evaluación de cepas nativas sugerir una posible diferenciación geográfica de estas con relación a bioproductos comerciales del género mencionado, que eventualmente podrían describir un comportamiento efectivo y estable como consecuencia de la adaptación ambiental local. Así mismo, el estudio de este recurso microbiológico permitirá eventualmente suplir las exigencias del campo a nivel socioeconómico, posibilitando la aplicación de métodos rentables que a largo plazo fomenten un modelo de agricultura sostenible en la región.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el potencial biocontrolador de cepas del género *Trichoderma* nativas de suelos agrícolas de Pamplona, Norte de Santander, que posibiliten la mitigación de fitopatógenos de interés agronómico y comercial.

Objetivos específicos

Caracterizar fenotípicamente los aislados de *Trichoderma* spp., considerando morfología y factores ecofisiológicos que influyen en su crecimiento.

Determinar las posibles aptitudes enzimáticas de los aislamientos de *Trichoderma* spp., como factores de virulencia y servicios ecosistémicos.

Evaluar el efecto antagónico *in-vitro* de las cepas de *Trichoderma* spp. frente a fitopatógenos de importancia agronómica y económica (*Fusarium* spp., *Botrytis* spp.).

Marco referencial

Antecedentes regionales

La investigación referente a la caracterización y potencial de cepas nativas de *Trichoderma* spp. ha incrementado gradualmente a nivel departamental, encontrando que se ha indagado sobre este género en las dos últimas décadas de manera intermitente. Una publicación encontrada del 2008, realizada en la Universidad Francisco de Paula Santander por Suárez & Cabrales, indicó el aislamiento de seis cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. procedentes de cuatro municipios diferentes de Norte de Santander, sometiéndolas a su vez a pruebas de antagonismo frente a cepas de *Moniliophthora roreri*, un fitopatógeno de alto impacto socioeconómico en la región para los cacaocultores. Al momento de comparar el comportamiento de las cepas del antagonista, se destacaron las cepas T1, T5 y T3 por presentar los mayores porcentajes de inhibición, por lo que se caracterizaron genotípicamente, identificándose como *T. asperellum* las dos primeras y *T. longibrachiatum* para la última mencionada. El comportamiento biocontrolador de los antagonistas fue evidenciado en la fuerte competencia por sustrato, rápido desarrollo y a su distintivo micoparasitismo, al describir que las cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas provocaban la deformación de las esporas del patógeno, haciéndolas inservibles al punto de imposibilitar su germinación luego de ser sembradas en un medio de cultivo.

Considerando nuevamente la problemática del gremio de cacaoteros causada por la Moniliasis, fitopatología causada por *Moniliophthora roreri*; se desarrolló una exploración reciente en la identificación de potenciales antagonistas nativos sobre este, estudio efectuado por López (2021) en conjunto con la Universidad Francisco de Paula Santander, teniendo como punto de partida la necesidad de buscar técnicas agrícolas que promuevan la mejora del rendimiento de uno de los cultivos que actualmente se encuentra en auge a nivel nacional como es el caso del

cacao. Dentro de esta investigación se caracterizaron a nivel molecular cepas aisladas de plantaciones del fruto, identificando entre ellas además de *Beauveria bassiana* y *Purpureocillium lilacinus* a *Trichoderma yunnanense*, encontrando en estas un potencial prometedor como antagonistas para la formulación de bioinsumos, debido que se logró la amplificación de un gen asociado con la síntesis de proteasas útiles dentro de mecanismos de parasitismo frente a una gran variedad de fitopatógenos.

En contraste, a nivel local, en el municipio de Pamplona se ha profundizado en el control biológico de patógenos que afectan los cultivos más representativos de la zona (destacando la lechuga, arveja y fresa), específicamente sobre la protección ante a *Fusarium* spp. y *Botrytis* spp. como resultado de la producción de proyectos de grado e investigación en la Universidad de Pamplona. En primer lugar es posible citar el trabajo desarrollado por Pérez (2021), quien optó por comparar la eficacia antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en cultivo de lechuga, con respecto a una cepa de tipo comercial; sus resultados demostraron la efectividad de los aislados frente a aislamientos también autóctonos de *Fusarium* spp., exhibiendo que el potencial biocontrolador de algunas cepas del género *Trichoderma* era similar a la ya estandarizada; así, por ejemplo, la cepa nativa de *Trichoderma* spp. codificada como TN4 al finalizar los días evaluados durante los cultivos duales describió un crecimiento micelial de aproximadamente 54 mm, en relación a los casi 38 mm alcanzado por el *Trichoderma* spp. comercial*;* deduciendo de esta forma que la cepa nativa asemeja o llega a superar el comportamiento controlador de esta última; además es relevante recalcar que estas dos cepas fueron categorizadas como grado 2 de capacidad antagónica de acuerdo con la escala establecida por Ezziyyani *et al.*(2004), valiéndose solo de la apreciación de competencia por sustrato. Por otra parte, Castellanos *et al.* (2021) se enfocaron en la experimentación de estrategias alternas de biocontrol dirigidas a *Fusarium oxysporum* en

cultivos de arveja en la vereda Monteadentro, Pamplona, que sean útiles para brindar asesoría oportuna a los agricultores, esto con el propósito de enfrentarse a la marchitez del fruto generada por el fitopatógeno; en esta oportunidad, se evaluó la efectividad de tratamientos químicos y biopreparados en contraste con el accionar de una cepa de *Trichoderma harzianum*; los resultados obtenidos permitieron inferir que este antagonista es capaz de disminuir la incidencia de la marchitez en valores semejantes a los registrados por el tratamiento con el plaguicida Benomil, además al analizar posibles modificaciones del ensayo que pueden afectar los valores registrados, *Trichoderma harzianum* presentó el menor porcentaje de variación (10 %), con respecto a los biopreparados en los cuales el valor de variación se estimó entre 25 % y 30 %.

Acerca de la atenuación de los efectos de *Botrytis* spp. sobre el cultivo de fresa, Ramos (2021) centró su investigación en realizar un análisis comparativo del potencial para reducir los efectos del patógeno nativo por parte de tres cepas de *Trichoderma* spp., una cepa comercial (TH) y dos autóctonas codificadas como TN01 y TN02, aisladas de un cultivo de fresa en la vereda Monteadentro de Pamplona y plantaciones de banano en el municipio de Bucarasica respectivamente. La confrontación de los antagonistas y el patógeno mostró notables variaciones en el comportamiento de los biocontroladores, de esta forma en primer lugar se pudo descartar el potencial protector de TN02 debido a que el grado de capacidad antagónica según Ezziyyani *et al.*(2004) fue de 0, en relación con las otras cepas de *Trichoderma* spp., categorizadas en el grado 4 al continuar su crecimiento sobre el micelio del patógeno; estas cepas describen un crecimiento análogo, sin embargo, TN01 inhibió totalmente a *Botrytis* spp. al cuarto día evidenciando un rápido crecimiento característico del género, mientras que TH alcanza a cubrir el micelio del patógeno al culminar los seis días. Partiendo de estas indagaciones a nivel local es posible inferir que las cepas nativas han tenido un rendimiento relevante en contraste con las

comerciales, relacionando la adaptación propia de estas a las condiciones ambientales y nutrientes de la zona.

Antecedentes nacionales

En Colombia se ha evaluado el potencial antagónico de cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de gran parte de regiones del país, tal y como se presentó en la investigación por parte de Smith *et al.* (2013), donde, se tomaron muestras de suelo de diversas ciudades adscritas a los departamentos de la Guajira, Magdalena, Atlántico, Bolívar, Córdoba, Antioquia, Risaralda, Valle del cauca, Cauca, Nariño, Santander, Boyacá, Cundinamarca y Amazonas; identificando a nivel molecular mediante los genes EF1-α1 y RPB2, especies frecuentes como *T. atroviride* , *T. koningiopsis* , *T. asperellum* , *T. espirale* , *T. harzianum* , *T. brevicompactum* y *T. longibrachiatum*; el potencial biocontrolador de estas se valoró sobre un patógeno indeseable en cultivos de lechuga y papa, *Sclerotinia sclerotiorum.* Los aislados permitieron el control del crecimiento sobre el agente infeccioso, resaltando *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. harzianum* al inhibir la germinación de cerca del 70-80 % de las estructuras de resistencia del fitopatógeno, encontrando un mejor rendimiento específicamente en aquellas cepas procedentes de Boyacá. Además, los autores mencionan que no existe una correlación representativa entre la tasa de crecimiento de las cepas frente al comportamiento antagónico, sino que se relaciona más con las estrategias enzimáticas y metabólicas propias de estas, enfatizando en quitinasas, glucanasas y síntesis de sustancias antibióticas (Smith *et al.,* 2013).

Otro de los cultivos importantes a nivel nacional es la palma de aceite, cultivo que se ha visto afectado por los efectos de *Phytophthora palmivora,* moho causal del pudrimiento del cogollo de la palma; motivo por el cual Sarria *et al*. (2021) analizaron el potencial del género

Trichoderma para proteger estas plantaciones; evaluando para estos fines cepas autóctonas del cultivo y comerciales, tomando en cuenta las interacciones de hifas, producción de metabolitos y competencia por espacio/nutrientes. En términos generales, cepas nativas registraron valores de inhibición cercanos al 100 %, cepas identificadas genotípicamente como *T. reesei* y *T. asperelloides,* usadas regularmente a nivel industrial.

Recientemente, en la Universidad del Sucre se adelantó una investigación sobre el efecto controlador de *Trichoderma* spp. sobre la "tristeza" de las plantaciones de aguacate, enfermedad derivada de la infección por *Phytophthora cinnamomi* como resultado de la podredumbre de la raíz. Montes *et al.* (2022), aislaron para ello cepas nativas del cultivo, indicando que al momento de poner en marcha los cultivos duales se establecieron porcentajes entre el 78 % y 93 % frente a la represión del crecimiento del patógeno para las especies *T. harzianum, T. asperellum, T. viride y T. longibrachiatum*. Además, pruebas enzimáticas permitieron prever el eventual aprovechamiento de las cepas dentro de la promoción del crecimiento de las plantaciones.

Por otra parte, en relación al biocontrol de *Fusarium* spp. en plantaciones de berenjena, Rodríguez *et al.* (2021) de la mano de la Universidad de Córdoba, encontraron en cepas del género *Trichoderma* aisladas de estos cultivos una estrategia alterna a la aplicación de agroquímicos para reducir la marchitez vascular causada por cepas también autóctonas del fitopatógeno. Al finalizar el ensayo de laboratorio fue evidente el accionar de la cepa codificada como TC05 al reducir el efecto de la patología, potencial validado en los elevados valores de inhibición presentados entre el 74 % y 92 %.

Antecedentes internacionales

Dentro del contexto internacional el número de publicaciones relacionadas con el género se ha extendido en los últimos años, enfocadas en su facultad para promover el crecimiento vegetal y no solo en el potencial antagonista. No obstante, la mayor parte de estas investigaciones centra sus actividades en la implementación de cepas estándar de *Trichoderma* spp., debido a la falta de interés por promover el estudio de cepas nativas. Sin embargo, la eficacia que parece estar contenida en organismos adaptados ambientalmente para tales propósitos, recobro actualmente la tendencia de aislar e identificar cepas autóctonas, resaltado así por ejemplo, la labor realizada por Korkom y Yildiz (2022), quienes examinaron el papel que cumple el género mencionado dentro de la limitación en la manifestación de los síntomas causados por *Macrophomina phaseolina* en cultivos de fresa, así como la promoción del crecimiento de las plantaciones. Lo anterior, mediante la evaluación de aislados propios de la provincia Aydin (Turquía); aislados identificados molecularmente como *T. harzianum* y *T. virens* que lograron porcentajes de inhibición superiores al 60 %.

Así mismo, en este país se hizo evidente el poder atenuador de *T. harzianum* y *T. atroviride* sobre los efectos de *Rhizoctonia solani* en plántulas de frijol; de acuerdo a los ensayos de laboratorio planteados por Bozdeveci y Karaoğlu (2023), los aislados del antagonista procedentes del suelo de áreas dedicadas al cultivo de té, una vez inoculados en plantas de frijol afectadas por el fitopatógeno favorecieron el crecimiento radicular y el engrosamiento de los tallos, mejorando de esta forma la condición física del tejido vegetal para superar la fitopatología.

Stange *et al.* (2023), se inclinaron por establecer en *Trichoderma* spp. una medida menos agresiva y contundente frente a fitopatologías que puedan comprometer la seguridad alimentaria, como es el caso de *Claviceps purpurea,* agente causal de alteraciones en cultivos de cereales cuya

importancia dentro del área de la salud recae en las sustancias toxicas producidas por el patógeno, que al ser ingeridas desencadenan una intoxicación, ocasionando trastornos en el sistema nervioso. Los aislados agrícolas de *Trichoderma* spp. demostraron su potencial antagónico sobre el patógeno en pruebas *in-vitro*; de la misma forma, estas capacidades fueron corroboradas en ensayos de invernadero con centeno, observando mejores resultados frente a la prevención de la enfermedad en aquellas plantas que recibieron el tratamiento con el antagonista en la zona de las raíces que al realizar la aspersión de esporas solo en la superficie.

Estudios proponen el empleo de este destacado género para contrarrestar patógenos implicados en considerables pérdidas económicas. El primero de ellos analiza dentro de otros antagonistas, el uso de *Trichoderma* spp. en el control de *Meloidogyne javanica* y *Phytophthora infestans,* evaluando cepas originarias de suelos de plantaciones de papa y tabaco en Zimbabwe, África; relacionando al biocontrolador valores de hasta el 97 % de capacidad antagónica en condiciones de laboratorio (Chinheya *et al.,* 2023); por lo que esta investigación revela el potencial de *Trichoderma* spp. no solo para controlar otros mohos, sino también nematodos plaga. Cabe señalar que *Phytophthora infestans* es considerado como un patógeno agresivo, al causar la pérdida total de los cultivos del tubérculo a nivel mundial. En el caso de Rokaya *et al.* (2023), obtuvieron resultados favorables sobre la prevención del tizón tardío generado por dicho fitopatógeno, examinado para esto la habilidad de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas en Nepal para disminuir las lesiones de las hojas en las plantas en aproximadamente el 50 %, comprobando a demás mejoras en el desarrollo del cultivo, de tal forma que se incrementó el rendimiento agrícola.

Marco conceptual

Trichoderma spp., un hongo polifacético

Trichoderma spp. fue descrito inicialmente a nivel morfológico por Persoon (1794) hace más de dos siglos, cuando dentro de su desconocimiento realizó la descripción de un organismo en Alemania, al que tiempo más tarde se le otorgaría el nombre del género *Trichoderma* debido a la similitud macroscópica de las observaciones (Waghunde *et al.*, 2016). El primer aislamiento registrado tuvo lugar en la India, específicamente en el antiguo estado de Madrás, realizado por Thakur y Norris (1928), cuando pretendían estudiar hongos aislados del suelo para evaluar la producción de amoniaco. De la misma forma, otra de las primeras capacidades bioquímicas mencionadas de *Trichoderma* spp. fue la síntesis de celulasas, investigación que transcurrió en plena Segunda Guerra Mundial y estuvo motivada por indicios en la degradación de la vestimenta de los soldados, en su momento el organismo implicado se denominó *T. viride* QM6a, sin embargo, posteriormente se renombró, asignándole *T. reesei* (Simmons, 1977). Por otra parte, en relación al potencial biocontrolador, las primeras pruebas de esta habilidad fueron descritas a partir de 1930, iniciando con el micoparasitismo de *T. lingorum* sobre *Rhizoctonia solani* y *T. harzianum* frente a *Sclerotium rolfsii*. En virtud de todas las investigaciones posteriores, el género cuenta actualmente con más de 100 especies registradas e identificadas genotípicamente, siendo notable su apreciación dentro del campo de la agricultura (Dutta *et al.*, 2022).

Clasificación taxonómica

El pasado taxonómico de *Trichoderma* spp. ha sido enigmático dado que en principio el género se conformó por hongos anamorfos presentes comúnmente en sustratos orgánicos vegetales y suelo, sin embargo, Tulasne y Tulasne (1865), terminaron por asignarle el estado teleomorfo

(*Hypocrea*). Actualmente, la clasificación aceptada es la propuesta por Persoon (1801), relacionada en la Tabla 1.

Tabla 1

Taxonomía de Trichoderma spp.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	*Trichoderma*

Fuente: Elaboración propia con base a Persoon (1801).

Cultivo *in-vitro*

En el cultivo de *Trichoderma* spp. frecuentemente se emplean medios sintéticos, destacando el agar avena y harina de maíz, medios en donde se considera que la morfología características del género es constante. Sin embargo, en términos generales la selección de los medios dependerá del análisis que se desee realizar, en consecuencia, se ha registrado el uso de medios pobres en requerimientos nutritivos que favorecen la observación de estructuras como fiálides, conidios y estructuras de resistencia, son ejemplos de ellos SNA (Agar Nutriente Sintético), agar zanahoria y CMD (Agar harina de maíz y dextrosa). Por otra parte, la fácil reproducción del género permite el empleo de diversos medios como PDA, agar Blakeslee, extracto de malta y Czapek. Por último, comúnmente para el cultivo de este microorganismo se establecen parámetros de incubación de 20 °C a 25 °C durante cerca de una semana, sometiendo inclusive a fuentes lumínicas o al desarrollo en total oscuridad (Gams & Bissett, 1998; Gams & Bissett, 2002; Samuels *et al*., 2006).

Descripción morfológica

Macroscópicamente

Como se mencionó anteriormente, la composición de los medios sobre los que crece *Trichoderma* spp. determina en muchas ocasiones su apariencia específicamente a simple vista; ahora bien, la descripción usual en medios ricos en nutrientes como PDA es: colonias blancas que en su mayoría se tornan verdes conforme transcurre el desarrollo del micelio aéreo, la conidiación tiende a desplazarse dentro de las tonalidades verdes a amarillas según la especie. Por otra parte, mientras el cultivo se realice en medios menos nutritivos como CMD las colonias son transparentes (Samuels *et al.*, 2002).

Generalmente, el reverso de las cajas de Petri suele ser beige o incoloro, sin embargo, ciertas especies producen pigmentos de coloraciones amarillas, verdes o cafés (Howell, 2003; Siddiquee, 2017). En las colonias de algunas especies se pueden percibir aromas característicos semejantes al coco, y en otros casos a lo que popularmente se refiere al olor a "moho" o humedad (Manoharachary *et al*., 2020).

Microscópicamente

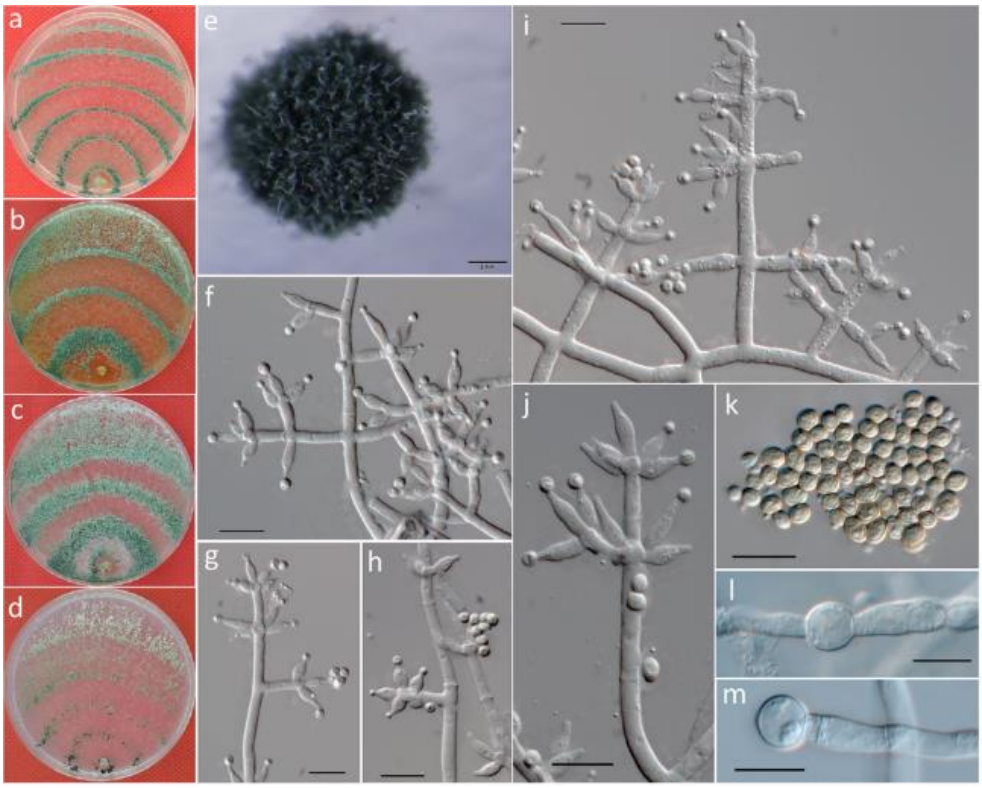
En muchas ocasiones, se identifican especies de acuerdo a la conformación de la estructura micelial, donde, cada organismo tendrá un modelo especifico de ramificación o disposición de fiálides. Así pues, en términos generales, los conidióforos pueden variar de levemente ramificados a repetidamente ramificados, a su vez estas estructuras son rectas o con ondulaciones en el área terminal y en algunos casos son estériles; las ramas pueden ser cortas, desde donde surgen fiálides solitarias o agrupadas en hasta más de tres, su forma usualmente varía según la especie de alargadas, lageniforme o cilíndrica. En el extremo de las fiálides surgen los conidios ya sean

redondos, elipsoidales, ovoides o cilíndricos, lisos o con prolongaciones que dan la impresión de tener alas o ser en forma de ampolla; anudado a esto, el color de los conidios habitualmente es verde, con variaciones menos recurrentes a tonalidades grisáceas, cafés o simplemente blancas. Es recurrente la formación de clamidosporas terminales o intercaladas, de color amarillo o verde (Gams & Bissett, 2002).

Todas estas características propias del género, tanto macroscópicas como microscópicas, mencionadas anteriormente pueden evidenciarse en las Figuras 1 y 2 a modo de ilustración del crecimiento diferencial de las colonias en los medios comúnmente usados, así como la disposición de los conidióforos.

Figura 1

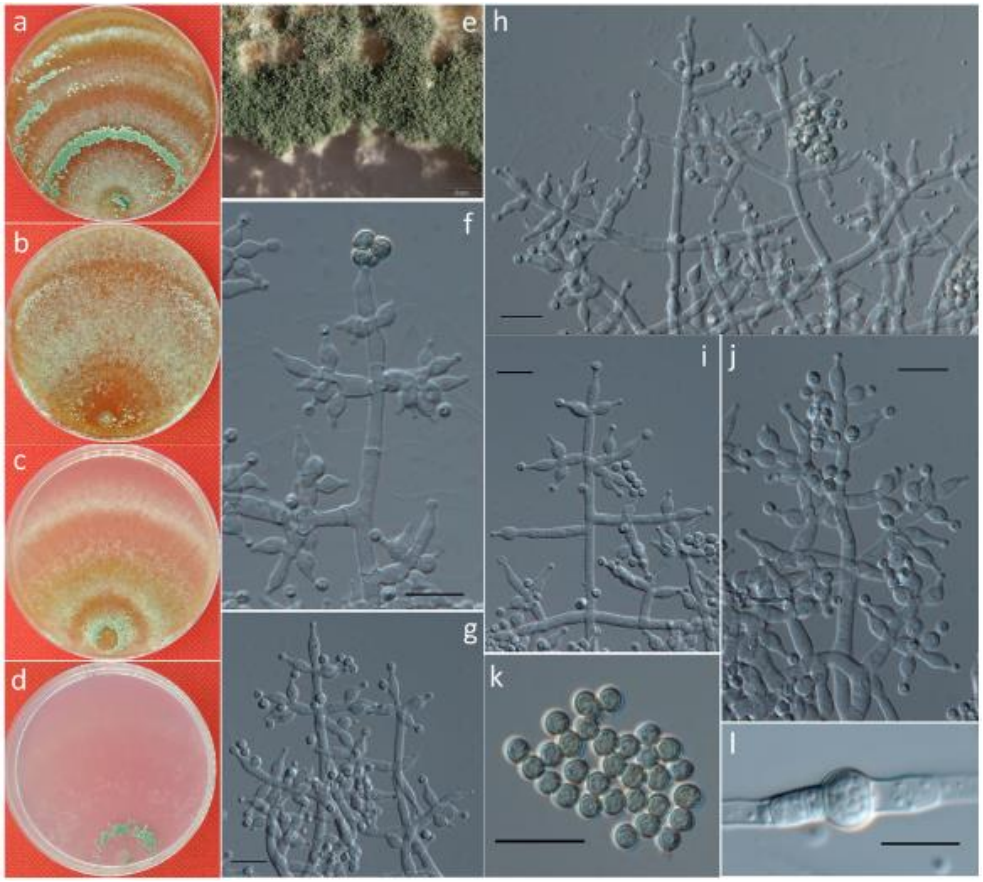
Morfología Trichoderma harzianum.



Nota. Cultivo a 20 °C en (a) CMD; (b) MEA; (c) PDA; (d) SNA. (e) Pústulas de conidiación en CMD. (f-j) Conidióforos en CMD. (k)conidios en CMD. (L-m) Clamidosporas en PDA. Fuente: Tomado de Tang *et al.* (2022).

Figura 2

Morfología Trichoderma pyramidale.



Nota. Cultivo a 25 °C en (a) CMD; (b) MEA; (c) PDA; (d) SNA. (e) Pústulas de conidiación en PDA. (f-j) Conidióforos en CMD. (k) conidios en CMD. (l-m) Clamidosporas en PDA. Fuente: Tomado de Tang *et al.* (2022).

Trichoderma spp., perfil bioquímico

Este género ha demostrado tener ejemplares de gran valor biotecnológico para diversas industrias además de la agrícola, esto gracias a las múltiples enzimas producidas por diversas especies que ofrecen un amplio panorama de aplicaciones; así pues, enzimas como las xilanasas sintetizadas por *T. reesei* han sido útiles en la búsqueda por elaborar biocombustibles (Silva *et al*., 2015). Por otra parte, dentro de las enzimas comúnmente asociadas a estos organismos y que están directamente implicadas en el poder biocontrolador otorgado, destacan quitinasas, celulasas,

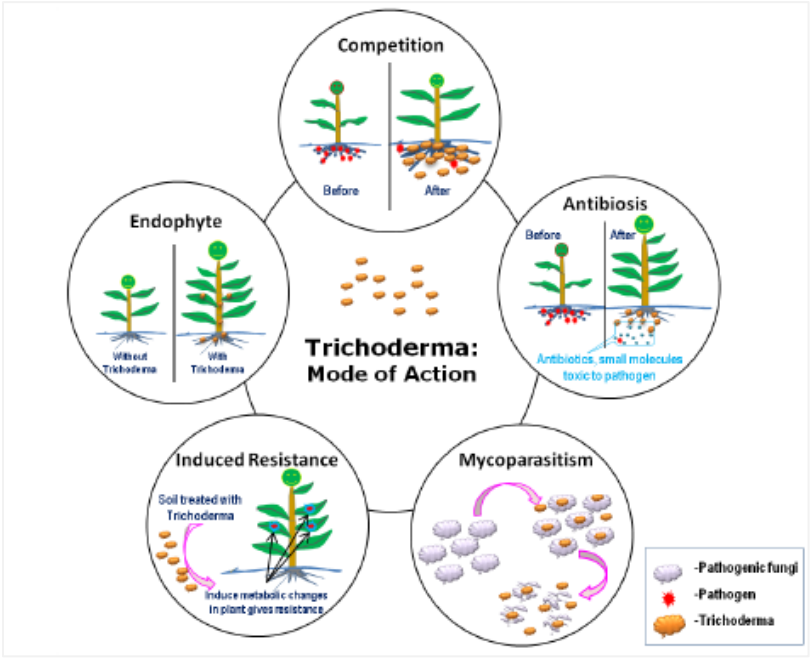
glucanasas y proteasas (S. Sharma *et al.*, 2019). Recientemente, se ha indicado la facultad de *Trichoderma* spp. para producir peroxidasas bajo ciertas condiciones, enzimas que se han relacionado con la posibilidad para detoxificar o degradar micotoxinas (Dini *et al*., 2022).

Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

Es bien sabido que el género *Trichoderma* actúa como antagonista frente a diversos fitopatógenos ya sea de forma directa (antibiosis, competencia, micoparasitismo), o transversalmente por medio de los beneficios que provee a las plantas como la inducción de mecanismos de resistencia, mejora en la captación de nutrientes, promoción del crecimiento vegetal y la solubilización de nutrientes (Waghunde *et al.* 2016); todas estas estrategias que plantea la versatilidad del género se indican en la Figura 3.

Figura 3

Accionar de Trichoderma spp. *frente a patógenos y promotor de crecimiento vegetal.*



Fuente: Tomado de Waghunde *et al.* (2016).

Acción directa

Antibiosis. La antibiosis es un término que se refiere a la capacidad de un organismo para sinterizar sustancias que resultan nocivas en el desarrollo de otro, *Trichoderma* spp, además de las enzimas que produce, en algunos casos su genética le permite excretar este tipo de sustancias. Inicialmente esta capacidad fue descrita en *T. virens*, productor de gliotoxina y gliovirina, siendo esta última particularmente inhibitoria para los géneros *Phytophthora* y *Pythium* (Howell *et al*., 1983). También se ha evidenciado en *T. harzianum* la síntesis de otros metabolitos como la alameticina dermadina, suzukacilina, trichodermina, trichotecenos y trichorzianina, que suponen estar implicados en el hiperparasitismo, actuando posiblemente después de metabolitos volátiles que debilitan a los fitopatógenos (Infante *et al.*, 2009; Waghunde *et al.*, 2016).

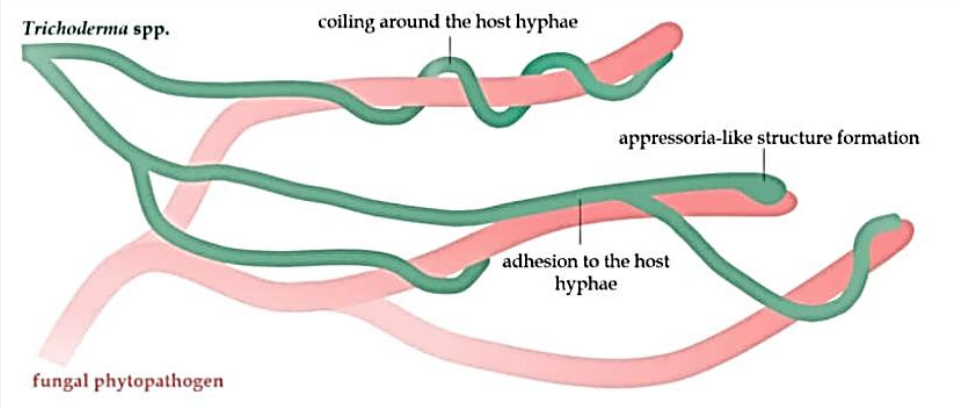
Competencia. De acuerdo a su ecología, *Trichoderma* spp. se desarrolla en diversos sustratos al consumir una amplia gama de fuentes de carbono; sumado a esto, la alta tasa de reproducción y su proporción en suelos facultan la violenta competición del género sobre patógenos debido a una captación más eficiente de requerimientos nutricionales y aprovechamiento del espacio, provocando así una drástica disminución de nutrientes que desplaza los fitopatógenos al generar la reducción en su población cuando ambos comparten un entorno (Tyśkiewicz *et al*., 2022).

Micoparasitismo. Probablemente el sistema de biocontrol más estudiado en el género es el micoparasitismo, estrategia donde el antagonista logra afectar al patógeno mediante la excreción de enzimas que modifican la estructura de la pared celular haciéndolas frágiles; inicialmente *Trichoderma* spp. reconoce la presencia principalmente de hongos fitopatógenos para

posteriormente adherirse y enrollarse sobre sus hifas (Figura 4), provocando en consecuencia el ataque del micelio del patógeno, dando lugar a una serie de eventos como la posibilidad del penetrar en las hifas ocasionando la expansión/deformación de estas células, seguido de la degeneración y lisis, teniendo como desenlace la muerte del patógeno (Asad, 2022; Yao *et al*., 2023). De acuerdo a Mukherjee *et al.* (2022), este ataque no se da solo a nivel micelial, sino que el parasitismo también puede desarrollarse en los esclerocios, estructuras de resistencia compactas que contienen reservas alimenticias, suprimiendo de esta forma el resurgimiento del patógeno.

Figura 4

Accionar del micoparasitismo de Trichoderma spp. *sobre hongos patógenos.*



Fuente: Tomado de Tyśkiewicz *et al.* (2022).

Acción Indirecta

Resistencia inducida. A diferencia del micoparasitismo, los mecanismos por medio de los cuales *Trichoderma* spp. otorga resistencia a las plantas no han sido esclarecidos en su totalidad; sin embargo, se ha indicado que dicha resistencia se puede dar a nivel sistémico o local, de acuerdo al estadio de la planta al momento de interaccionar con el simbionte, así por ejemplo, una relación temprana de este con la semilla permite tener una protección sistémica, mientras que si la inoculación se da en las hojas se trata de una respuesta local en la reducción de los efectos de

patógenos (Adnan *et al.*, 2019). Se asume que tales efectos son mediados por fitohormonas producidas en mayores cantidades cuando *Trichoderma* spp. forma parte del conjunto, favoreciendo de esta manera la producción de metabolitos secundarios por parte de las plantas, compuestos como enzimas, polifenoles, flavonoides, lignina y proteínas solubles que se asocian con propiedades de defensa natural frente a fitopatógenos, incluyendo hongos y nematodos (Nawrocka & Małolepsza, 2013; Pandey *et al.*, 2023; Yan *et al.*, 2021).

Solubilización y secuestro de nutrientes. La captación mayoritaria de los nutrientes por parte de *Trichoderma* spp. juega un papel indirecto en el biocontrol de patógenos, relacionado además con el rápido crecimiento de las especies del género. Así pues, información experimental respalda la utilización de nutrientes en suelos que de otra forma se desaprovecharían por parte de las plantas, donde, se beneficia el reciclaje del nitrógeno, solubilización del fosfato, reducción de Cu (II) y Fe (III)); en cuanto a la acción controladora, por ejemplo, este último elemento se une a sideróforos producidos por *Trichoderma* spp. sufriendo una trasformación que lo lleva de hierro insoluble a soluble, facilitando la absorción de hierro para uso de las plantas, estas terminan por agotar el recurso, disminuyendo su concentración en el suelo para el aprovechamiento por parte de otras formas de vida como diversos patógenos, entorpeciendo por tanto su desarrollo (Dutta *et al*., 2022; Tyśkiewicz *et al.*, 2022).

Marco legal

En Colombia, para el 2012 se presentó la **"Política Nacional para la Gestión Integral de la Biodiversidad y sus Servicios Ecosistémicos (PNGIBSE)"**, propuesta dentro de la cual se incorporan estrategias que buscan preservar la biodiversidad que distingue al país en el exterior, incluyendo en el término además de fauna y flora, a los genes de todos los organismos nativos, las especies de estos, así como la totalidad de los ecosistemas que habitan dado que se refleja en ellos una posible dependencia nacional para el aprovechamiento de recursos, permitiendo instaurar procesos beneficiosos para el crecimiento socioeconómico y cultural de la población. La política mencionada propone la necesidad de hacer un uso responsable de los recursos biológicos, promoviendo además la concientización de la sociedad en general sobre su relevancia (Política Nacional para la Gestión integral de la Biodiversidad y sus Servicios Ecosistémicos, 2012).

Partiendo de esto, en primer lugar, el aprovechamiento de los recursos biológicos de Colombia se encuentra protegido conforme a lo contemplado en el Decreto 2811 de 1974, entendiendo que los recursos naturales renovables son considerados como patrimonio nacional, extendiéndose a cualquier recurso biológico extraído de afluentes, capa terrestre o marítima.

Lo anterior en cuanto a aspectos generales relacionados con el uso de bienes biológicos y genéticos; sin embargo, específicamente para efectos de las actividades agrícolas, es el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), la entidad que regula el beneficio formal de estos. De esta forma, en la Resolución 0375 de 2004, se encuentran consignados los requisitos a cumplir para el **"Registro y Control de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia"**, a fin de evitar riesgos potenciales que afecten la integridad de los Colombianos, brindando para ello información y acompañamiento oportuno en el desarrollo, implementación y distribución de este tipo de productos; normativa que incluye insumos destinados al control de plagas, en donde,

el artículo 7º establece los deberes de las personas responsables de su producción, exigiendo el uso únicamente de los recursos de una zona delimitada y autorizada; recursos que deben conservarse bajo estrictas condiciones de bioseguridad y por ultimo atender a las pautas instauradas por el ICA. Por otra parte, estos bioinsumos deben ser sometidos a ensayos que determinen su rendimiento en instalaciones propicias que cuenten con la autorización del ente regulador, sometiéndose al cumplimiento de las disposiciones contempladas en la Resolución 698 de 2011.

Recientemente, en la Resolución 068370 de 2020, se formalizaron los lineamientos para el registro de productores, así como los parámetros a seguir por estos para desarrollar actividades de producción, envase e importación de bioinsumos de uso en la agricultura. Normativa que posicionaría el potencial del género *Trichoderma* dentro de las definiciones de **"Inoculante biológico" y/o "agente microbial para control de plagas"** según sea el caso. En relación al empleo de microorganismo dentro de las formulaciones, se debe indicar en la solicitud del registro el tipo de bioinsumo, al igual que el género/especie del organismo que haga parte de su composición y la concentración expresada en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) o esporas por unidad de volumen/masa; estableciendo la pureza microbiológica de las bioformulaciones frente a agentes infecciosos para plantas o animales (incluido el hombre).

En otro orden de ideas, como institución la Universidad de Pamplona cuenta con la aprobación para realizar **"actividades de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial"** conforme a lo estipulado en el Decreto 1376 de 2013, estatuto que fue establecido por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, dentro del que se garantiza el aprovechamiento de estos recursos para el fortalecimiento de la investigación científica de las Universidades nacionales.

Metodología

Colección de aislados agrícolas

Se evaluaron cepas de *Trichoderma* spp. procedentes de diversos cultivos agrícolas de Pamplona (N. de S.), conservadas en el semillero de Investigación en Microbiología y Biotecnología (SIMBIO) de la Universidad de Pamplona; se seleccionaron aislamientos agrícolas específicos codificados como *Th2, Th4, Th5, Th12, Th14* y *Th19*. En relación a los aislados evaluados, cada uno es originario de un área o plantación agrícola especificada en la Figura 5.

Figura 5

Georreferenciación de zonas muestreadas para los aislamientos evaluados.



Aislamiento	Cultivo de procedencia	Vereda
Th2	Arveja	Monteadentro
Th4	Huerta orgánica de hierbas	Monteadentro
Th5	Huerta orgánica de hierbas	Monteadentro
Th12	Ajo	Monteadentro
Th14	Fresa	Monteadentro
Th19	Arveja	Zulia

Nota. Google Earth (s.f). https://earth.google.com/web/@7.37283528, Todos los derechos reservados 2022 por Google. Adaptado con permiso del autor. Fuente: Autor.

Caracterización fenotípica

Observaciones morfológicas

Las características morfologías de las seis cepas se establecieron según lo propuesto por Chen & Zhuang (2017), con una breve modificación. Para esto se partió de cultivos de entre 4 días de crecimiento a 25 °C en PDA, posteriormente se tomaron discos de 5 mm de diámetro del crecimiento activo que se dispusieron a 1 cm del borde de las cajas de Petri (9 cm), empleando para cada cepa los siguientes medios: PDA, SNA, CMD y Avena (ver Apéndice A). En su

incubación se consideraron parámetros como someterlas a fotoperiodos de luz/oscuridad, 12 h cada uno, mantenidas a temperatura ambiente durante una semana; realizando además la medición diaria del crecimiento radial descrito por cada cepa a fin de establecer velocidades de crecimiento. En relación a las características microscópicas, se establecieron realizando montajes en fresco con una solución de KOH al 3 %, empleando además un estereoscopio con el propósito de visualizar la posible presencia de exudados. Para efectos de la identificación presuntiva a nivel de especie, se describió la estructuración del micelio a escala microscópica, asociando las observaciones a la diferenciación de especies de la clave dicotómica asignada por Gams y Bissett (2002).

Ecofisiología

La influencia de factores como pH y temperatura sobre el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* spp. se determinó conforme a lo planteado por Villamizar *et al*. (2021). De esta forma, se partió de cultivos en PDA de 10 días con los que se preparó una suspensión de conidios de concentración 1 x 10^6 conidios/mL. Para esto los conidios se tomaron del medio de cultivo con una solución de Tween 80 al 0,5 %, realizando el ajuste de la concentración requerida mediante el uso de una cámara de Neubauer. Una vez preparada la suspensión de conidios, se inocularon 10 µL en PDA cuyo pH fue ajustado a 3, 5, 7 y 9 usando NaOH o HCl 0,1 N según correspondiera, e incubando a 25 °C durante 7 días. Así mismo, se sembraron 10 µL de la suspensión en cajas de PDA para incubar a diversas temperaturas (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C y 35 °C), por el mismo periodo de tiempo. En ambos casos se tomaron mediciones diarias del desarrollo micelial de forma perpendicular a fin de considerar el efecto de dichos parámetros sobre los diámetros de crecimiento.

Caracterización factores de virulencia y servicios ecosistémicos

Las actividades enzimáticas de los aislados de *Trichoderma* spp. se establecieron de forma cualitativa, inoculando las cepas en cada uno de los medios correspondientes e incubando a 25 °C durante al menos 4 días, realizando observaciones diarias a fin de evidenciar posibles variaciones.

Glucanasas

Frente a la ausencia de pruebas cualitativas se optó por la preparación del medio agar salvado de trigo, WBA, por sus siglas en inglés Wheat Bran Agar (ver Apéndice A), donde, el salvado de trigo es la única potencial fuente de carbono para el desarrollo de las cepas (Eida *et al*., 2011). De acuerdo a la información presentada por Biswas *et al.* (2019), se reportó que usando el salvado como sustrato es posible medir una producción representativa de β-1,4-glucanasa. Así mismo se realizó un proceso de extracción de β-glucanos a partir del salvado de trigo, triturando en primer lugar las partículas del cereal para luego someter a una extracción usando NaOH 0,1 M, dejando en reposo por 45 minutos. A continuación, el material insoluble se retiró filtrando la solución para luego adicionar etanol en una concentración 25 % (vol/vol), precipitando de manera presuntiva β-1,3 y β-1,4-glucanos (Redmond & Fielder, 2013). Finalmente se reformuló el WBA reemplazando el salvado de trigo por el precipitado obtenido.

Celulasas

En este ensayo cada cepa se sembró en el medio agar carboximetilcelulosa (CMC) (ver Apéndice A). Transcurrido el tiempo apropiado se realizó la revelación de acuerdo a lo descrito por Castillo *et al.* (2015), añadiendo rojo Congo 0,05 % hasta cubrir completamente la superficie del medio, se dejó transcurrir 10 minutos para posteriormente desteñir las placas con NaCl 1M

permaneciendo en reposo por 1 hora. A continuación, se retiró la solución salina para cubrir con ácido acético al 2 % durante 10 segundos. Por último, se tomó como resultado positivo para celulasas aquellas cepas en las que se manifestó una zona de aclaramiento a su alrededor.

Proteasas

Esta capacidad se evaluó en el medio Skim Milk (ver apéndice A), señalando si las cepas presentan esta característica mediante la formación de halos de hidrolisis que rodean el crecimiento fúngico (Amid *et al*., 2018); a fin de posibilitar la observación de dichas zonas de aclaramiento se sugirió una incubación solo durante dos días, debido a que el rápido crecimiento de *Trichoderma* spp. llega a cubrir estas áreas, dificultando su apreciación (Acero, 2010).

Amilasas

Se inocularon los aislados sobre agar almidón (Apéndice A), empleando el método de punción. Transcurridos cuatro días de incubación se usó Lugol como revelador, añadiéndolo sobre las cajas asegurándose de cubrir totalmente la superficie del medio, luego se descartó el exceso y se indicó como positivas las cepas cuyo crecimiento fúngico mostró halos claros en su contorno (Acero, 2010).

Amonificación

Para este ensayo cada una de las cepas se inoculó en el medio urea (Apéndice A), en el cual la actividad de las ureasas se evidencia por el viraje del amarillo al rosado-rojizo, producto de hidrolisis de urea y consecuente producción de amoniaco (Expósito *et al*., 2010).

Nitrificación

La prueba para determinar si las cepas pueden actuar como agentes nitrificantes se efectuó sembrándolas en agar amonio (ver Apéndice A), tomando como resultado positivo aquellas que pudiesen crecer luego del periodo de incubación establecido (N. C. R. Moreno & Lozano, 2006).

Actividad antagónica *in-vitro* frente a *Fusarium* spp. y *Botrytis* spp.

Cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. fue sometida a ensayos *in-vitro* de antagonismo con el propósito de determinar su potencial biocontrolador frente a aislados locales también agrícolas de *Fusarium* spp. y *Botrytis* spp. conservados en SIMBIO. La capacidad antagónica de las cepas fue evaluada mediante la determinación de aspectos como la potencial competencia por nutrientes y espacio entre el antagonista y los fitopatógenos, posible micoparasitismo, grado de invasión y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los patógenos vegetales.

Conforme a lo descrito por Liu *et al*. (2020), inicialmente se cultivaron tanto las cepas del antagonista como del fitopatógeno en PDA a 25 °C durante 5 días. Después del periodo de incubación se tomaron discos de 5 mm de su micelio, ubicando cada uno en extremos opuestos de cajas de Petri (90 mm) con PDA. Los cultivos duales se incubaron a 25 °C por un lapso de 10 días, realizando el seguimiento de las mediciones del radio de crecimiento para cada organismo, cada ensayo ejecutado además con controles negativos de los patógenos; esta determinación *in-vitro* contó con tres replicas.

En contraste, se intentó proporcionar parámetros equitativos para el desarrollo tanto del patógeno como del antagonista mediante el enfrentamiento de estos en AES (Ver Apéndice A), de acuerdo a la composición expuesta por Herrán y García (2015).

Identificación de estrategias de micoparasitismo

Partiendo de los cultivos duales se realizaron montajes en fresco con KOH 3 % de las zonas de confluencia entre el micelio del antagonista y el patógeno, esto con la finalidad de observar microscópicamente los posibles mecanismos de interacción entre hifas que forman parte del micoparasitismo propio del género *Trichoderma.*

Estimación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR)

El PICR permite indicar el grado de capacidad antagónica de las cepas controladoras, por lo que se tomaron en cuenta las medidas del crecimiento radial de los fitopatógenos en los cultivos duales tradicionales y sus testigos durante 10 días en oscuridad constante (Rodríguez & Wang, 2020), a fin de estimar el porcentaje de inhibición al aplicar la formula presentada por Ezziyyani *et al*. (2004);

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde, R1 comprende la medida del crecimiento del fitopatógeno en el testigo y R2 obedece al desarrollo radial del mismo en los enfrentamientos.

Determinación del grado de invasión

Las observaciones del desarrollo micelial de *Trichoderma* spp. en cercanías o sobre los fitopatógenos permitieron establecer de forma cualitativa el nivel de invasión alcanzado por el antagonista, lo anterior conforme a la categorización propuesta por Ezziyyani *et al.*(2004), consignada en la Tabla 2, ensayo *in-vitro* que contó con tres replicas.

Tabla 2

Rangos de capacidad antagónica y asignación del poder biocontrolador.

Grado	Capacidad antagónica	Poder biocontrolador
0	Ninguna invasión de la superficie de la cepa patógena	Muy malo
1	Invasión de ¼ de la superficie de la cepa patógena	Malo
2	Invasión de ½ de la superficie de la cepa patógena	Deficiente
3	Invasión total de la superficie de la cepa patógena	Bueno
4	Invasión total de la superficie de la cepa patógena esporulación sobre ella	Muy bueno

Fuente: Tomado de las escalas descritas por Ezziyyani *et al.* (2004) y Astorga *et al.* (2014).

Análisis estadístico

Las mediciones obtenidas en cada uno de los procesos antes mencionados fueron analizadas mediante el análisis de varianza (ANOVA) simple o multifactorial según fuese el caso, empleando el método LSD (Least significant difference) como test de comparaciones múltiples, evaluando la influencia de los parámetros asignados para un nivel de significación del 5 %; usando como software estadístico Statgraphics Centurion 19.

Resultados y análisis

Caracterización fenotípica

A continuación, se presentan los resultados fenotípicos correspondientes a las cepas agrícolas nativas, exponiendo su conducta en diversos medios y parámetros de crecimiento.

Observaciones morfológicas

Durante esta fase se empleó el medio SNA y CMD con el propósito de promover la esporulación y mejorar la visualización de fiálides y clamidosporas de los aislados, sin embargo, para la estimación de los tamaños de las estructuras se tomaron en cuenta las desarrolladas en PDA debido a que, en muchas ocasiones en SNA la morfología de los conidios no es constante, llegando a variar considerablemente (Merjan, 2017). En el caso del agar avena, su consideración dentro la caracterización se relacionó con la estimulación de la esporulación, así como propiciar la identificación eventual del estado teleomorfo en alguna de las cepas debido a que se ha descrito en pocas especies (Rezusta *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2015).

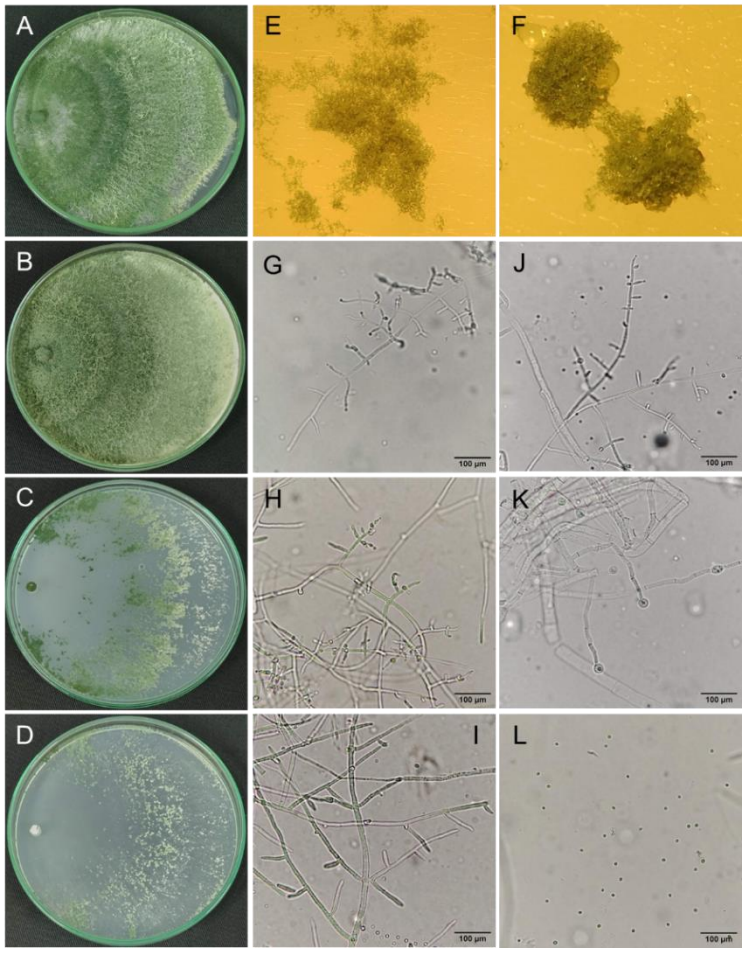
En general, el desarrollo micelial de las cepas seleccionadas evidenció características diferenciales entre cada una de ellas en los medios propuestos, destacando los mejores crecimientos en PDA y agar avena, medios en los cuales todas la cepas desarrollaron micelio aéreo en comparación con las pústulas de conidiación y micelio sumergido apreciado en los medios restantes ; no obstante, de acuerdo al seguimiento diario presentado en el Apéndice B, adoptan las características propias del género al desarrollar colonias blancas que con el transcurso del periodo de incubación se tornaban verdes, señalando además su peculiar olor con ligera percepción a coco generado por la habilidad de ciertas especies para sintetizar compuestos aromáticos volátiles, como el caso del 6-pentil-α-pirona u otros que llegan incluso a actuar como sustancias antibióticas, útiles

dentro del potencial biocontrolador (Manoharachary *et al.*, 2020). Las estructuras de resistencia, clamidosporas, fueron formadas en cada uno de los medios por todos los aislados, asociado a un prolongado tiempo de incubación, con un mayor número en SNA y CMD, estableciendo que se trataba de clamidosporas subglobosas terminales conforme a la caracterización morfológica realizada por Hua *et al.* (2021).

La cepa aislada del cultivo de arveja en la vereda Monteadentro (*Th2*), cubrió la totalidad de la caja de PDA y agar avena para el quinto día, iniciando desde este momento la conidiación, así mismo en estos medios fue evidente la formación de anillos concéntrico, donde la esporulación fue mayor. Por otra parte, para el sexto día en SNA y CMD el radio de la colonia hialina alcanzó los 90 mm, desarrollando gradualmente pústulas de conidiación que se tornaron completamente verdes al finalizar el seguimiento del crecimiento (ver Apéndice Figura B1), presentando exudado solo en las pústulas del medio CMD (Figura 6-F). A nivel microscópico, esta primera cepa tuvo una configuración levemente ramificada, fiálides lageniformes terminales solitarias, conidios verdes lisos cuyo tamaño fue estimado en 4,2 µm x 4,7 µm (ver Apéndice C1). Atendiendo a estas observaciones, se identificó de forma presuntiva el aislado como *T. longibrachiatum* (Apéndice D), características que concuerdan con la descripción del clado Longibrachiatum realizada por Samuels *et al.* (2012). Sin embargo, en ocasiones las observaciones morfológicas no permiten una diferenciación clara entre *T. longibrachiatum* y *T. pseudokoningii* (Prameeladevi *et al.*, 2018).

Figura 6

Morfología característica del aislado Th2.



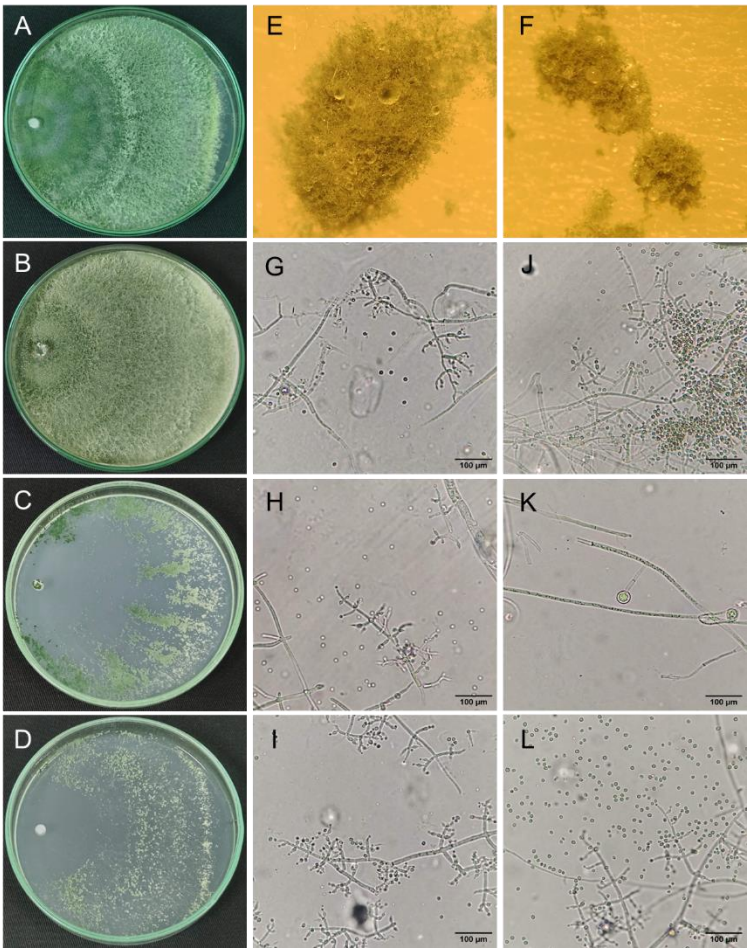
Nota. (A-D) Cultivos de 7 días a 25 °C (A. PDA; B. Avena; C. SNA; D. CMD); (E, F) Pústulas de conidiación (E. SNA, 7 días; F. CMD, 7 días); (G-J) Conidióforos y fiálides, 7 días (G. PDA; H. Avena; I. SNA; J. CMD); K. Clamidosporas en CMD 7 días; L. Conidios en agar avena, 7 días. Fuente: Autor

En los medios ensayados *Th4* alcanzó el borde opuesto de la caja al sexto día (ver Apéndice B2), evidenciando de manera cualitativa un menor grado de esporulación en PDA y avena en relación a la cepa *Th2*; sin embargo, la tonalidad de la colonia es más fuerte debido a un mayor índice de conidiación en los días posteriores; en SNA y CMD las pústulas superficialmente tenían exudados (Figura 7). Microscópicamente, *Th4* desarrolla conidióforos continuamente ramificados, con hasta tres fiálides por rama (Figura 7-I), la forma de las fiálides es lageniforme con conidios

subglobosos de tonalidad verde, estimando el tamaño de estos últimos en 4,1 µm x 3,9 µm en PDA (ver Apéndice C2); descripción que se asemeja posiblemente a los agregados de *T. harzianum* (Apéndice D), que comparte similitudes con las especificaciones de Tang *et al.* (2022) para la especie en PDA y CMD.

Figura 7

Morfología característica del aislado Th4.



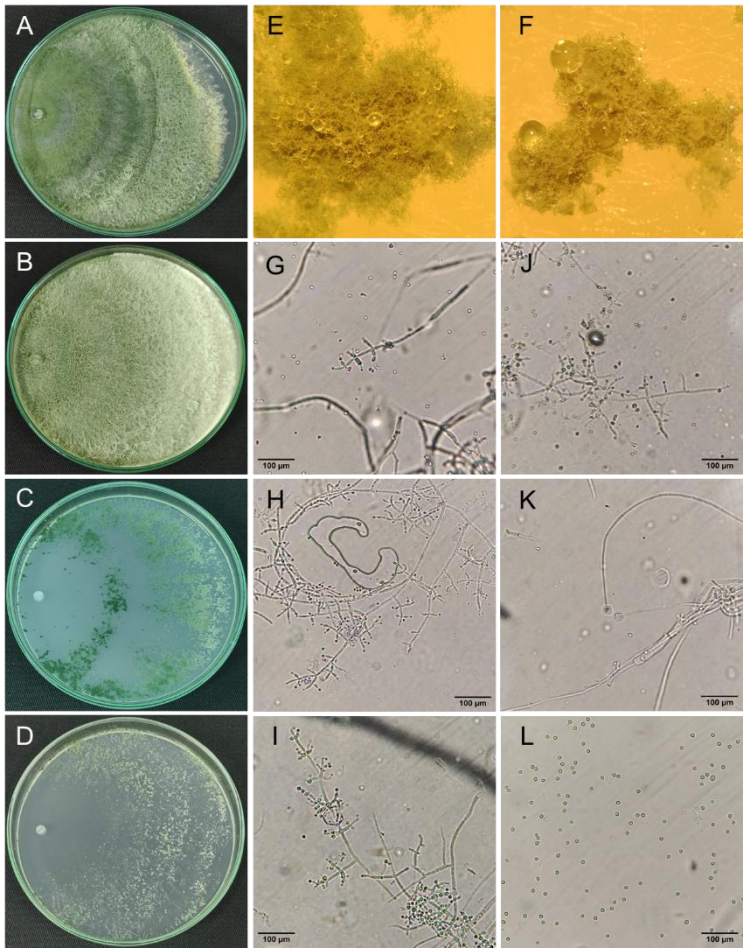
Nota. (A-D) Cultivos de 7 días a 25 °C (A. PDA; B. Avena; C. SNA; D. CMD); (E, F) Pústulas de conidiación (E. SNA, 7 días; F. CMD, 7 días); (G-J) Conidióforos y fiálides, 7 días (G. PDA; H. Avena; I. SNA; J. CMD); K. Clamidospora en CMD, 7 días; L. Conidios en SNA, 7 días. Fuente: Autor

Th5 completó su crecimiento en los medios el día 6, momento donde fue evidente el inicio de la conidiación y la formación de anillos concéntricos en PDA (ver Apéndice B3); se observaron

exudados sobre las pústulas de los medios SNA y CMD (Figura 8). Las microscopias muestran conidióforos ramificados, fiálides lageniformes y conidios levemente cilíndricos de 3,0 µm x 2,7 µm (Apéndice C3); atributos asociados de forma presumible a *T. koningii* de acuerdo a lo indicado en el Apéndice D; el crecimiento descrito en PDA junto a las medidas de los conidios se correlacionan con la descripción realizada por Samuels *et al.* (2006) para los agregados de la especie.

Figura 8

Morfología característica del aislado Th5.

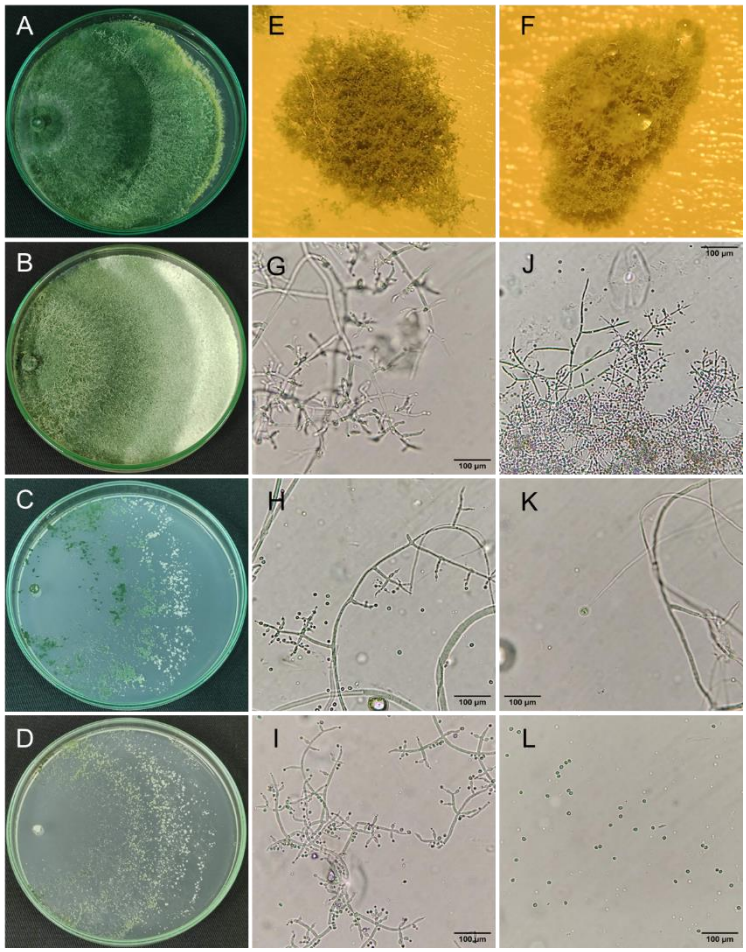


Nota. (A-D) Cultivos de 7 días a 25 °C (A. PDA; B. Avena; C. SNA; D. CMD); (E, F) Pústulas de conidiación (E. SNA, 7 días; F. CMD, 7 días); (G-J) Conidióforos y fiálides, 7 días (G. PDA; H. Avena; I. SNA; J. CMD); K. Clamidosporas en CMD, 7 días; L. Conidios en CMD, 7 días. Fuente: Autor.

En relación al aislado del cultivo de ajo, *Th12* completó su crecimiento en agar avena al sexto día, mientras que, en PDA, SNA y CMD esto se logró al término del séptimo día. La tonalidad de las colonias en los medios PDA y avena tiende a ser levemente fuerte en contraste con los demás aislados, notando igualmente el inicio de la esporulación para el quinto día (ver Apéndice B4). En la figura 9, El crecimiento en SNA y CMD aparenta seguir la formación de anillos en la disposición de las pústulas, en comparación con las demás cepas, en donde, la localización de estos cúmulos de esporas fue difusa; encontrando además exudados en las pústulas de CMD; microscópicamente *Th12* está conformada por conidióforos ramificados de hasta 6 µm de ancho, fiálides lageniformes, conidios lisos redondos de aproximadamente 2,8 µm x 2,8 µm en PDA (ver Apéndice C4), conidios que conforme a la Figura 9-L presentan una tonalidad verde oscura. Estas especificas características permitieron identificar a *Th12* de manera presuntiva como *T. atroviride* (Apéndice D). La descripción de *Th12* se relaciona con la de Samuels *et al.* (2002), quienes, señalaron una tendencia por parte de la especie para desarrollar sus fiálides en ángulos cercanos a los 90°, también mencionan que *T.atroviride* puede ser confundida con *T. aggressivum* al tener fiálides de tamaños semejantes.

Figura 9

Morfología característica del aislado Th12.



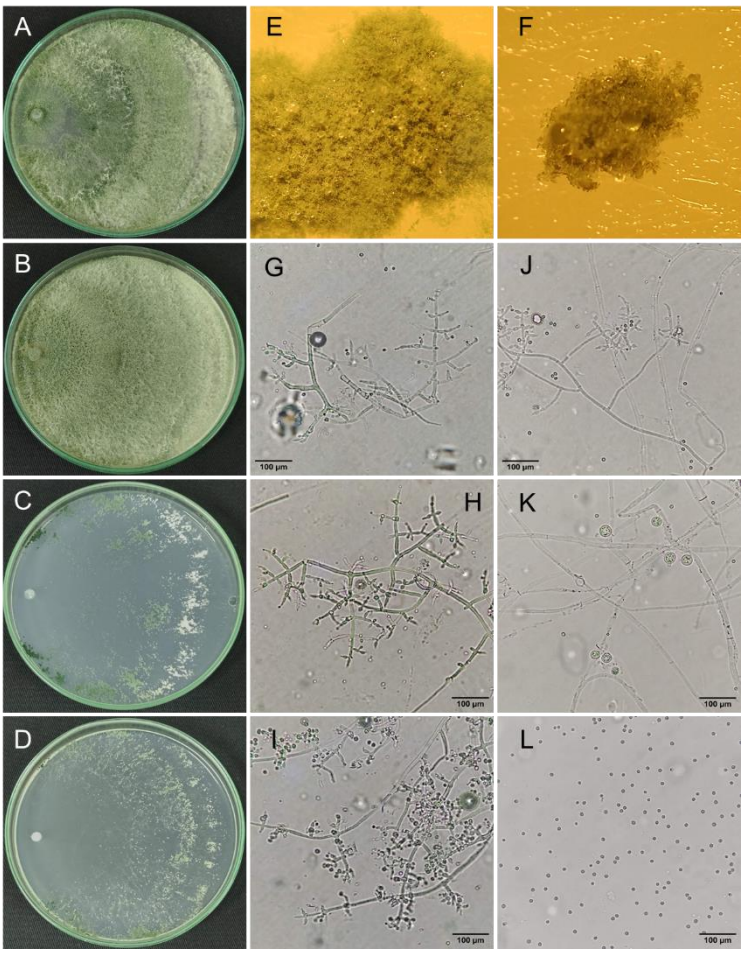
Nota. (A-D) Cultivos de 7 días a 25 °C (A. PDA; B. Avena; C. SNA; D. CMD); (E, F) Pústulas de conidiación (E. SNA, 7 días; F. CMD, 7 días); (G-J) Conidióforos y fiálides, 7 días (G. PDA; H. Avena; I. SNA; J. CMD); K. Clamidospora en SNA, 7 días; L. Conidios en SNA, 7 días. Fuente: Autor.

En la cepa procedente del cultivo de Fresa la esporulación fue menor para el quinto día en PDA y avena, incrementando para el día siguiente; sin embargo, la tonalidad en este punto es tenue en contraste con los demás aislados. El crecimiento de *Th14* cubrió los medios ensayados en su totalidad al finalizar el día 7 (ver Apéndice B5). De acuerdo la Figura 10, la cepa presentó exudados sobre las pústulas en CMD y SNA, destacando que la de este ultimó medio se consideró de mayor tamaño; adicionalmente el micelio está conformado por conidióforos ramificados constantemente

con fiálides lageniformes, que en sus extremos desarrollan conidios lisos cuyo tamaño se estimó en 3,2 µm x 3,4 µm en PDA (Apéndice C5); obedeciendo a esta descripción se infiere que *Th14* puede corresponder a *T. citrinoviride* (ver Apéndice D), correspondencia que semejante a la apariencia de la colonia en PDA y las descripciones microscópicas presentadas para la especie por Park *et al.* (2005) y Fan *et al.* (2020).

Figura 10

Morfología característica del aislado Th14.

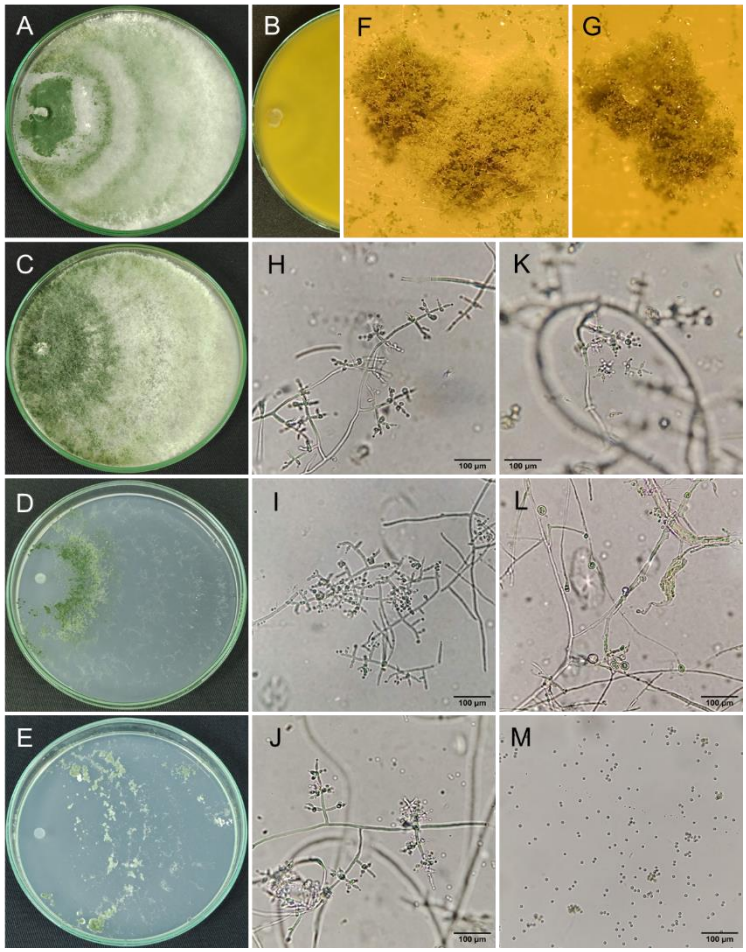


Nota. (A-D) Cultivos de 7 días a 25 °C (A. PDA; B. Avena; C. SNA; D. CMD); (E, F) Pústulas de conidiación (E. SNA, 7 días; F. CMD, 7 días); (G-J) Conidióforos y fiálides, 7 días (G. PDA; H. Avena; I. SNA; J. CMD); K. Clamidosporas en CMD, 7 días; L. Conidios en CMD, 7 días. Fuente: Autor.

Por otro lado, el aislado del cultivo de arveja en la vereda el Zulia fue la cepa que a primera vista mostró un crecimiento mayormente diferencial, resaltando que la extensión del micelio en los primeros tres días fue lenta, ocupando la totalidad de los medios al día 6 (Ver Apéndice B6). A diferencia de las otras cepas, en *Th19* la esporulación es notable en los surcos de elevación del micelio aéreo a partir de donde se separan los anillos concéntricos característicos. Otro rasgo distintivo de *Th19* fue el desarrollo de abundante micelio aéreo compacto, ya que en las demás cepas el micelio aéreo era escaso y laxo. De las pústulas formadas en SNA y CMD, solo la de este último presentó exudado. La configuración de la cepa a nivel microscópico fue de conidióforos poco ramificados, fiálides lageniformes y conidios lisos de tamaño estimado en 3,4 µm x 3,5 µm en PDA (Apéndice C6); por lo que toda esta descripción en conjunto con la producción de pigmento por parte de la cepa en PDA como se observa en la Figura 11, permitió que se le asignara de manera presuntiva la especie *T. reesei* (ver Apéndice D), esta identificación podría ser constatada con las observaciones realizadas en PDA para la especie por Suesca (2012), donde se evidenciaron características comparables.

Figura 11.

Morfología característica del aislado Th19.



Nota. (A-D) Cultivos de 7 días a 25 °C (A. PDA-anverso; B. PDA-reverso; C. Avena; D. SNA; E. CMD); (F, G) Pústulas de conidiación (F. SNA, 7 días; G. CMD, 7 días); (H-K) Conidióforos y fiálides, 7 días (H. PDA; I. Avena; J. SNA; K. CMD); L. Clamidosporas en CMD, 7 días; M. Conidios en SNA, 7 días. Fuente: Autor.

Referente a uno de los parámetros de incubación, si bien la exposición directa a fuentes lumínicas resultar perjudicial para algunos géneros de hongos al inhibirlos, *Trichoderma* spp. encuentra en este factor un apoyo para su propagación, al propiciar la conidiación de ciertos ejemplares (Chávez *et al.*, 2008; Morlá *et al.*, 2010). De hecho, Ellison *et al.* (1981), hacen referencia a que la incubación bajo fotoperiodos permite visualizar la formación de los anillos concéntricos característicos del género, indicando que suelen ser regiones donde se induce la

esporulación durante los momentos de luz, siendo necesario en algunos casos estancar el crecimiento del micelio vegetativo para que inicie la conidiogénesis; esta información permite dilucidar el por qué esta etapa fue evidente luego de que las cepas nativas cubrieran la mayor parte de los medios de cultivo; al respecto Khurana *et al.* (1993) estiman que este suceso tiene lugar entre los días 5 a 6, periodo comparable con los días promedios en los que inició la esporulación en las cepas evaluadas.

En otro orden de ideas, una de las características por las que destaca el género *Trichoderma* es por desarrollarse en poco tiempo, siendo este un rasgo diferencial entre las especies de la sección *Trichoderma* spp. señalada por Gams & Bissett (2002), motivo por el que se estimaron las velocidades de crecimiento radial (VCR) descritas por las cepas en cada uno de los medios empleados, esto mediante un análisis de regresión lineal del seguimiento diario presentado en Apéndice E1, a fin de valorar una posible diferenciación en la tasa de crecimiento.

La Tabla 3 muestra las velocidades de crecimiento radial de cada una de las cepas en los diferentes medios ensayados, donde, se considera que existen diferencias significativas entre las

velocidades establecidas en PDA en relación a las desarrolladas en los demás medios ($p<0,05$); contemplando una variación superior entre las mayores y menores velocidades por medio, así por ejemplo, en PDA *Th12* crece radialmente a una mayor velocidad con respecto a *Th19* (0,78 mm/h > 0,60 mm/h) señalando entre estas la mayor variación entre cepas; en agar avena *Th4* crece rápido a diferencia de *Th5* y *Th12* (0,69 mm/h > 0,60 mm/h)*; Th19* describió una mejora tasa de crecimiento que *Th14* (0,68 mm/h > 0,56 mm/h)*,* y por ultimo *Th2* superó en VCR a *Th12* (0,65 mm/h > 0,54 mm/h). No obstante, existe una similitud entre las medias de las velocidades de las cepas en general (p=0,4247), determinando de esta forma que se desarrollan indistintamente (Apéndice E2).

Tabla 3

Velocidad de crecimiento radial (VCR).

Cepa	Velocidad de crecimiento radial (mm/h)			
	PDA	Agar avena	SNA	CMD
Th2	0,75	0,68	0,67	0,65
Th4	0,70	0,69	0,65	0,59
Th5	0,76	0,60	0,65	0,60
Th12	0,78	0,60	0,58	0,54
Th14	0,72	0,65	0,56	0,59
Th19	0,60	0,64	0,68	0,58

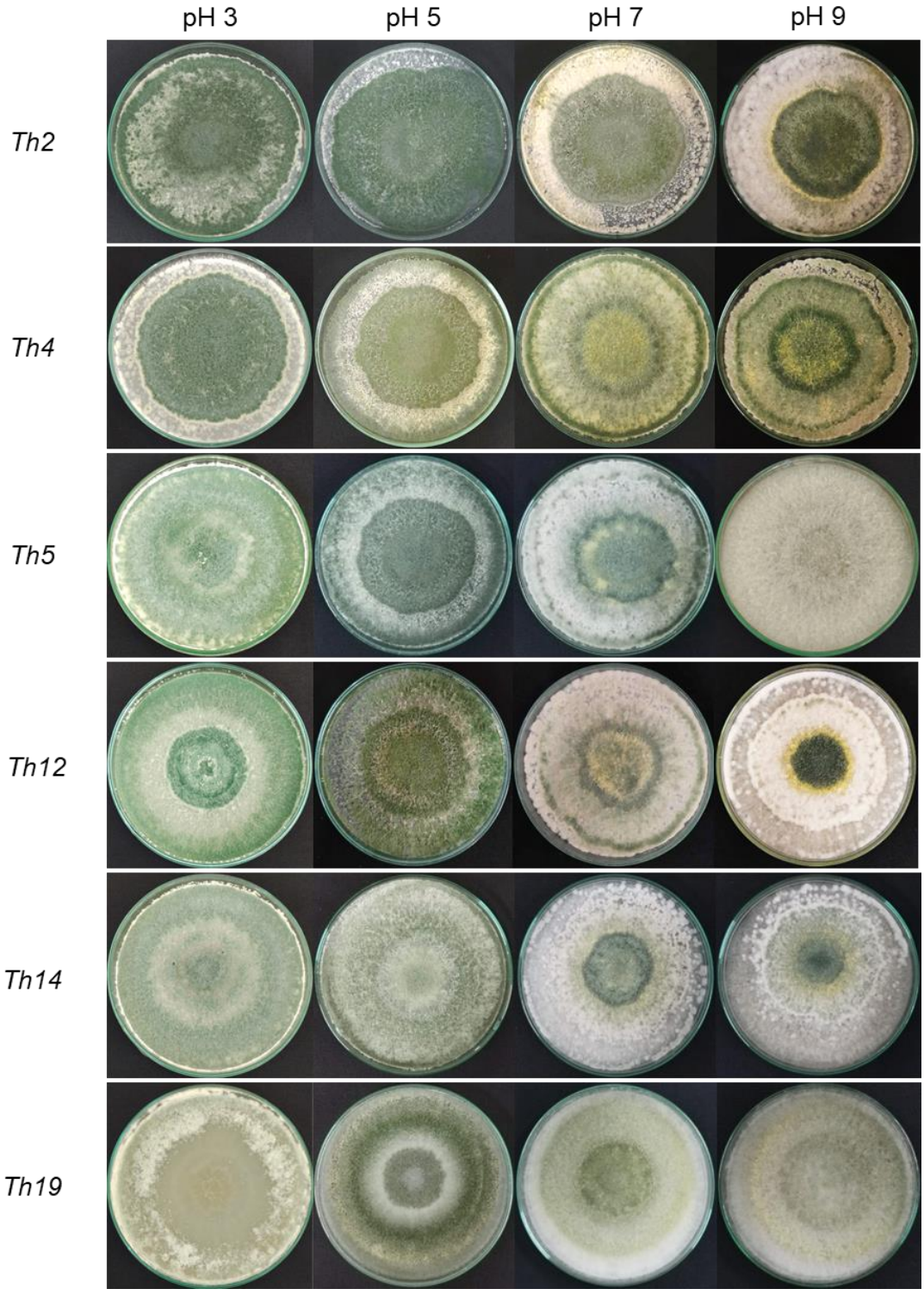
Nota. Velocidades de crecimiento radial descritas en los medios propuestos (LSD, $p<0,05$). Fuente: Autor.

Ecofisiología

Efecto del pH sobre el desarrollo de *Trichoderma* spp. Fue posible estimar el impacto de este parámetro sobre el desarrollo de micelio aéreo y esporulación de las cepas, destacando que los conidios de cada una de ellas germinaron de forma adecuada para los valores de pH evaluados. En términos generales, describen un crecimiento diametral similar con leves variaciones entre la escala de pH planteada; sin embargo, la diferenciación del efecto de estos valores es marcada en las observaciones realizadas al finalizar el periodo de incubación, evidenciada por la desigualdad en los patrones de esporulación presentados en la Figura 12.

Figura 12

Desarrollo micelial de las cepas bajo la influencia del pH.



Nota. Crecimiento de cepas en cuatro pH diferentes incubadas a 25 °C, 7 días. Fuente: Autor.

De la anterior figura se destaca que el crecimiento y esporulación manifestado fue semejante en *Th2*, *Th12* y *Th14* en los cuatro valores de pH, reduciendo gradualmente el grado de conidiación a medida que incrementa el pH. *Th5* presentó un comportamiento análogo, no obstante, fue el único de los aislados donde el pH ligeramente alcalino impidió la esporulación. Por otra parte, para *Th4* se considera que las variaciones de pH no alteran la conidiación de forma significativa; pero en el caso de *Th19*, en pH 3 disminuye el surgimiento de micelio aéreo, presentándose solo en los extremos del crecimiento, donde la esporulación fue escasa de coloración verde, aunque poco perceptible; mostrando un mayor índice de esporulación a pH 5.

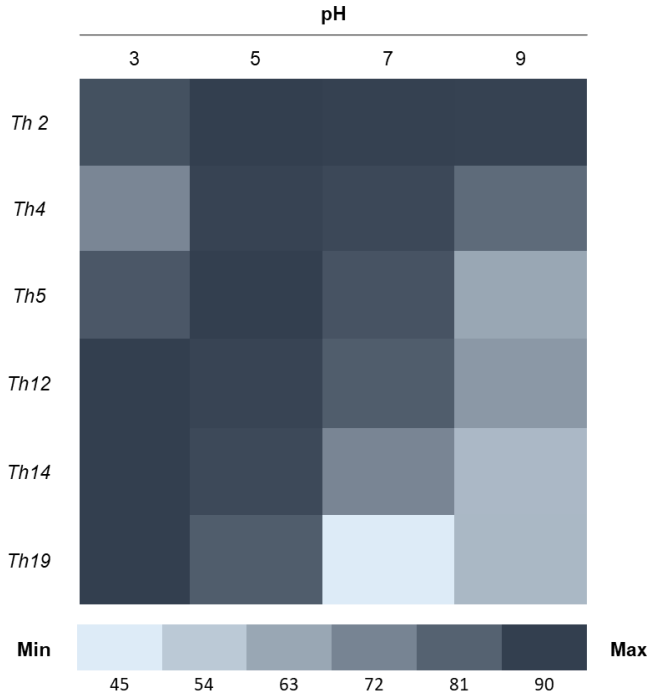
Con respecto a la coloración en la esporulación visible, la tonalidad es notablemente fuerte a pH 9 para *Th2*, *Th4*, *Th12* y *Th14*, resaltando además una tonalidad amarilla. La conidiación en *Th19* tuvo tonalidades verdes y amarillas tenues, específicamente en pH 7 y 9; en relación a la producción de pigmento característico de este aislado, no fue evidente en el desarrollo de la escala de pH, sino que en su lugar el reverso de las colonias se tornó de una coloración crema.

Además de las características cualitativas, el efecto del pH sobre el diámetro de crecimiento (DC) de las cepas fue otro punto a considerar, al establecer que el crecimiento no era uniforme dentro de un mismo valor de pH ni entre las cepas (ver Apéndice F1), por lo que para tener un determinante de comparación se contrastaron los DC del día en que al menos una de estas completara su extensión sobre el medio, razón por la que se analizaron los valores obtenidos para el cuarto día de ensayo.

La Figura 13 muestra una representación del comportamiento de las cepas con respecto a las variaciones de pH, permitiendo establecer en ella como el desarrollo de estas a un valor particular determina el diámetro de crecimiento de la colonia.

Figura 13

Efecto del pH en el crecimiento de las cepas de Trichoderma spp.



Nota. Efecto del pH sobre el diámetro de las colonias (mm) para el día 4. La intensidad de color aumenta hacia los valores máximos del DC (LSD, p<0,05). Fuente: Autor.

De esta manera, destaca el desarrollo de *Th2* debido a que se comportó de manera similar dentro de la escala de pH evaluada, completando en su mayoría el crecimiento sobre el medio para el cuarto día, mientras que para *Th4* y *Th5* esto solo ocurrió a pH 5 y pH 7. Resalta, además, el patrón de los DC descritos por *Th12* y *Th14,* cepas que suponen una conducta inversamente proporcional, en otras palabras, en la medida en que aumenta el valor de pH, disminuye el diámetro de crecimiento, obteniendo mayores mediciones en los pH ácidos. Por otra parte, *Th19* logró un mejor crecimiento a pH ácido en contraste con el valor neutro y alcalino, donde, los DC no superaron los 60 mm. Existen diferencias significativas entre los diámetros de crecimiento de la columna alcalina y las acidas (ver Apéndice F2), efecto que se visualiza en la anterior figura al encontrar una mayor intensidad de color en las dos primeras columnas en contraste con la última,

presentando allí la mayoría de las cepas sus mínimos DC. Por otro lado, la ausencia de diferencias significativas en los pH intermedios permite inferir que estos podrían considerarse con valores óptimos para el desarrollo de la mayoría de las cepas de *Trichoderma* spp.

Aunque se encontraron desigualdades en aspectos como la esporulación y diferencias en los DC para un día especifico, se hace necesario destacar que ninguno de los pH inhibió la germinación de los conidios ni el diámetro de crecimiento final de los aislados puesto que, al finalizar el ensayo hacia el día 7 todos alcanzaron los 90 mm, lo que permite inferir que estas cepas pueden ser expuestas a un amplio rango de pH sin afectar su crecimiento.

La capacidad de las cepas de *Trichoderma* spp. para adaptar su crecimiento a diferentes valores de pH se fundamenta en el potencial del género como agente de control biológico (ACB), debido a que, al tratarse de un organismo común en suelos está expuesto a una cantidad de factores ambientales que de no ser contrarrestados afectarían los mecanismos de biocontrol. Dentro de estos factores destaca el pH, dado que si el ambiente no es adecuado se reprime la producción de metabolitos implicados en la inhibición de patógenos, por lo que la estrategia que emplea el género es equilibrar el pH de su nicho ecológico (Moreno *et al.,* 2007).

Daryaei *et al.* (2016) sugieren que someter las especies de *Trichoderma* spp. a una escala diferenciada de pH ocasiona cambios en la morfología, tasa de crecimiento y esporulación de los organismos, así, por ejemplo, informaron que al cultivar *T. atroviride* en valores de pH desde 3,5 a 8,5, la esporulación incrementó desde el valor ácido hasta el ensayo en pH 6,5; no obstante, la cantidad de conidios sufrió una disminución hacia el valor alcalino, conducta que se asemeja a la manifestada por las cepas *Th5* y *Th12*.

Por otra parte, en relación a la tasa de crecimiento, *T. koningiopsis* experimenta bajas velocidades a pH 4,5 mientras que, especies como *T. hamatum* y *T. spirale* se desarrollan bien en

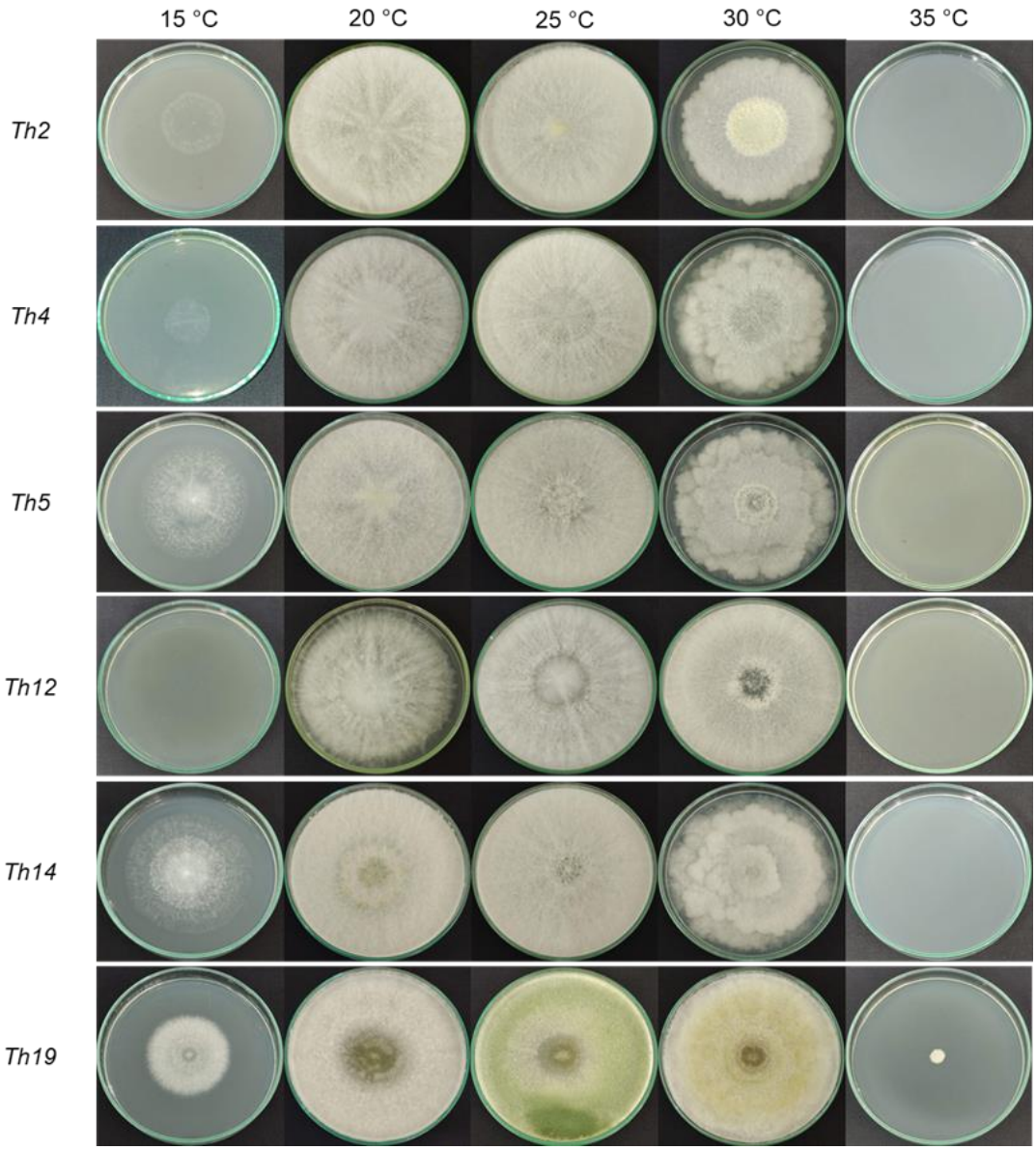
valores que van desde 4,5 a 7,5 (Wang *et al.*, 2022); *T. longibrachiatum* ha registrado valores máximos de crecimiento dentro del rango a pH 6,5 y 7,5 (Shahid *et al.*, 2011); por su parte en este último valor de *T. harzianum* describe un crecimiento lento con baja esporulación (M. Moreno *et al.*, 2007) . En el caso de *T. viride,* Romero (2012) menciona que el pH puede causar variaciones en la apariencia y textura de las colonias así como en la esporulación, evidenciando que más allá de propiciar la producción de conidios, exponer la especie a pH 5 permite una esporulación verde y una alta tasa de crecimiento, a diferencia de la alcalinidad, donde, la esporulación puede variar entre verde claro a amarillo, y genera una disminución en el crecimiento.

Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de *Trichoderma* spp. Someter las cepas a variaciones de temperatura logró afectar notablemente el crecimiento de estas, demostrado en las modificaciones que sufrió la configuración de las colonias. La incubación a 15 °C dificultó la germinación de las esporas al provocar que el surgimiento del micelio sea lento, destacando además que las bajas temperaturas impidieron totalmente el desarrollo de *Th12*. Los conidios de *Th2* germinaron desde los 15 °C hasta los 30 °C; en las temperaturas intermedias el desarrollo de micelio fue similar con indicios de conidiación en tonalidad amarilla, mientras que, el grado de esporulación fue notario a 30 °C para el séptimo día; sin embargo, bajo esta última temperatura el borde de la colonia no fue filamentoso regular, en su lugar se tornó ondulado; el comportamiento de *Th4* y *Th5* fue similar, aunque no se observó esporulación en ninguno de los casos, se diferencia el borde de las colonias a 30 °C, desarrollando un micelio fino con normalidad al principio, pero a medida que continuaba la incubación sobre este micelio se superponía más crecimiento dando la apariencia de pétalos con bordes lobulados. Por su parte, *Th12* desarrolló un micelio suelto y ligero a 20 °C, que se compacto en la medida en que se incrementó la temperatura de incubación. En *Th14* fue evidente la formación de un anillo concéntrico como producto de una leve esporulación

verde, fase que no se observó a 25 °C pese a que la disposición del micelio fue semejante; por el contrario, a 30°C esta cepa describió la configuración antes mencionada de “pétalos”. Toda esta descripción se visualiza en la Figura 14.

Figura 14

Desarrollo micelial de las cepas en las temperaturas evaluadas.

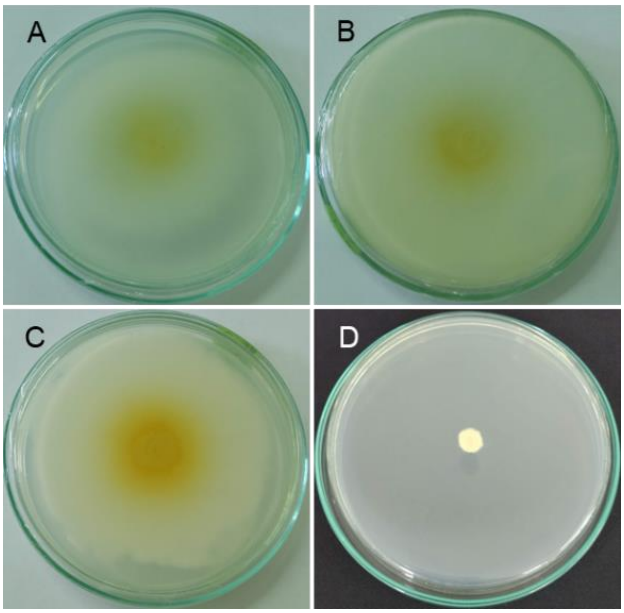


Nota. Crecimiento descrito por las cepas en diversas temperaturas al completar el día 7. Fuente: Autor.

Th19 se comportó de manera regular a 20 °C, 25 °C y 30 °C, al presentar colonias de micelio aéreo denso, desarrollando una mayor esporulación a 25 °C. En relación a la producción de pigmento, esta parece no ser afectada drásticamente dado que la única variación perceptible es la intensidad de la colocación, que conforme a la Figura 15 es mayor a 30°C; destacando que a 15 °C fue inhibida la síntesis de pigmento. Por otro lado, la incubación de las cepas a 35 °C inhibió la germinación de los conidios, a excepción de *Th19*, en donde, pese a que el diámetro de la colonia fue reducido la producción del pigmento fue tenue.

Figura 15

Efecto de la temperatura sobre la producción de pigmento por Th19.



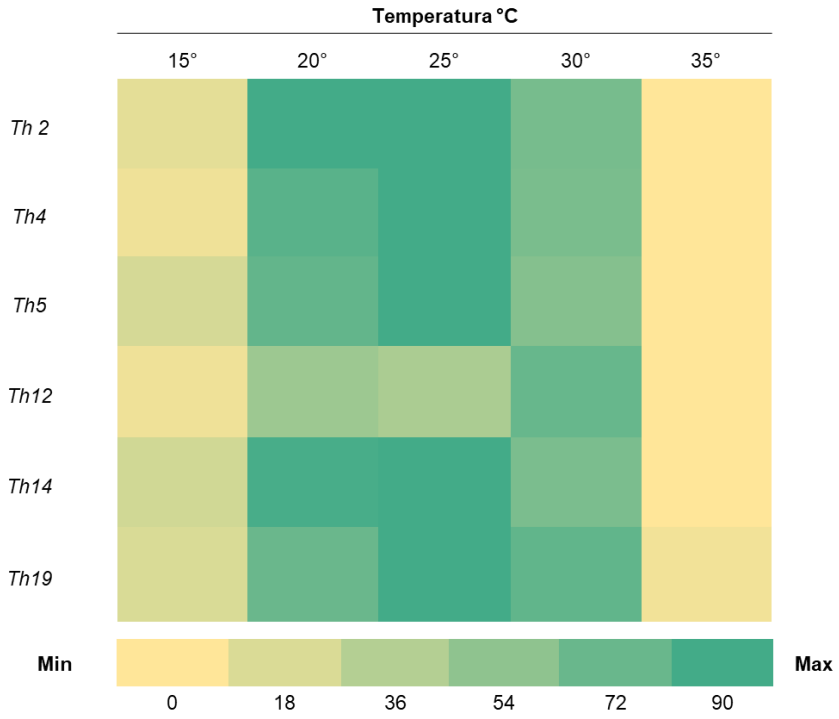
Nota. Producción de pigmento en: A. 20 °C; B. 25 °C; C. 30 °C; D. 35 °C, crecimiento de 4 días. Fuente: Autor.

Dentro del rango de temperaturas ensayadas, las cepas tuvieron un tendencia a completar su crecimiento para el cuarto día (Apéndice G1), por lo que se analizó el efecto de dicho parámetro sobre los diámetros de crecimiento hasta este punto, representando el comportamiento de las cepas en la Figura 16, donde, a primera vista destaca la represión del crecimiento en la mayor

temperatura, estableciendo que la exposición a 35 °C inhibió la germinación de las esporas, exceptuando a *Th19;* en el extremo opuesto, la temperatura más baja no reprime la germinación de los conidios pero, tiene un impacto directo sobre el diámetro de crecimiento al generar que su incremento sea paulatino. Se estima que todas las cepas desarrollan un crecimiento óptimo entre los 20 °C y 25 °C, no obstante, la excepción es *Th12* dado que para el cuarto día el DC fue evidentemente mayor a 30 °C. Así mismo, se evidenció un patrón similar entre las cepas a 30 °C, estimando para todas ellas diámetros de crecimiento que oscilaron entre un rango de 54 mm a 72 mm.

Figura 16

Efecto de la temperatura en el crecimiento de Trichoderma spp.



Nota. Efecto del pH en el diámetro de las colonias (mm) para el día 4. La intensidad de color aumenta hacia los valores máximos del DC (LSD, p<0,05). Fuente: Autor.

El análisis estadístico estableció diferencias significativas entre los diámetros de crecimiento descritos a 15 °C y 35 °C con respecto a las mediciones de las temperaturas restantes (p<0,05); del mismo modo indica que existen similitudes entre los valores relacionados a 20 °C y 25 °C, así como de las mediciones registradas por la primera de estas y la de 30 °C (ver Apéndice G2), indicando de esta manera en las cepas una conducta mesófila al valorar que su crecimiento es óptimo dentro de un intervalo de 20 °C - 30 °C.

La germinación y desarrollo de las cepas a 15 °C puede estar relacionada con su adaptación a las temperaturas ambientales de Pamplona dado que el valor medio del municipio es de 16 °C (Pamplona, s. f.), resaltando que se han registrado incluso temperaturas máximas de 20 °C (*Anual y Mensual Del Tiempo - Pamplona, Colombia*, s. f.); lo anterior debido a que aunque durante los primeros días se observó una etapa de retraso (sin crecimiento aparente), posteriormente fue factible el crecimiento de los aislados.

Trichoderma es un género de hongos que adapta su crecimiento a un amplio espectro de temperaturas, comportamiento evidente en las cepas evaluadas. De hecho, se considera que la adaptación a temperaturas especificas llega a ser un factor que posibilita la discriminación preliminar entre especies, así, por ejemplo, *T. harzianum* y *T. atroviride* se diferencian en las tasas de crecimiento a 30 °C - 35 °C, donde, solo la primera de ellas describe un rápido crecimiento que, a diferencia de la segunda el crecimiento es nulo en la mayor temperatura; de acuerdo a esta información podría descartarse la caracterización preliminar del aislado *Th4* dado que su comportamiento siguió la conducta mencionada para la última especie. Esta diferenciación de temperaturas también podría aplicarse para la verificación de especies del clado Longibrachiatum ya que Samuels *et al*. (2012), indican que las especies pertenecientes a dicha sección tienden a desarrollarse adecuadamente en temperaturas superiores a los 35 °C, que en ocasiones se podrían

catalogar como posibles patógenos animales; por lo que, según esta información, de las cepas asignadas de forma presumible al clado (*Th2, Th14* y *Th19*), solo *Th19* cumpliría esta particularidad. Park *et al*. (2005), argumentan que *T. citrinoviride* establece su temperatura óptima de crecimiento a 35 °C al exponer un rápido desarrollo, lo que supone una desconfianza con la identificación preliminar.

Aunque existen registros de crecimiento entre 15 °C - 35 °C, es mayor la proporción de especies que se desarrollan a 20 °C. Especies como *T. afroharzianum, T. atrobrunneum, T. guizhouense* y *T. gamsii*, además de las ya mencionadas, presentan patrones proporcionales de crecimiento, incrementando sus DC en razón al aumento de la temperatura en un rango desde los 10 °C a 25 °C, momento desde el cual, sí se continua ampliando el rango hacia mayores temperaturas se da un descenso en la tasa de crecimiento, sin embargo, especies como *T. orientale* sustentan un crecimiento satisfactorio por encima de los 25 °C, incluso hasta los 40 °C (Chihat *et al*., 2021).

Además del DC, la variación de temperaturas influye en el proceso de conidiación, al respecto Gezgin *et al.* (2020), indicaron que especies como *T. atroviride* y *T. citrinoviride* llevan a cabo este proceso desde los 15 °C hasta los 35 °C, con una mayor producción en las temperaturas intermedias, llegando incluso a reprimir la esporulación cuando las especies son sometidas a temperaturas menores o mayores; los autores implican adicionalmente otro factor dentro del proceso, que es la exposición a una fuente lumínica, mejorando el crecimiento de *Trichoderma* spp. en temperaturas que van desde los 15 °C hasta los 30 °C. Por su parte, Carro *et al.* (2021), menciona que en este tipo de ensayos la concentración de inoculo inicial es un factor determinante al evaluar el crecimiento a 15 °C, donde, concentraciones de 2 x 10^{-7} UFC/mL favorecen el incremento de la tasa de crecimiento en *T. gamsii.*

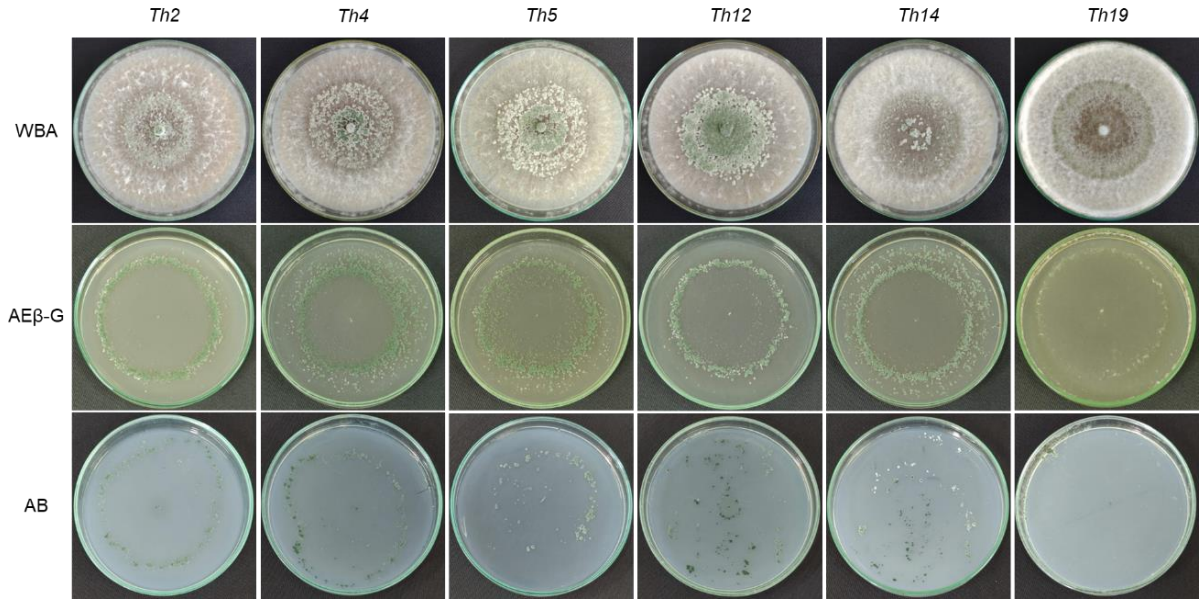
Caracterización factores de virulencia y servicios ecosistémicos

Las cepas de origen agrícola exhibieron resultados positivos para la mayor parte de ensayos planteados, identificando de manera cualitativa en todas ellas la producción de enzimas implicadas en los mecanismos antagónicos propios del género.

La potencial producción de glucanasas se determinó mediante el ensayo de medios cuya composición incluía fuentes presumibles de β-glucanos, en el caso del WBA según lo informado por Biswas *et al.* (2019), este recurso puede ser suministrado por el salvado de trigo; de esta forma se implementó el medio AEβ-G, que comprendía una reformulación del WBA, reemplazando el salvado por el precipitado de una extracción química de β-glucanos. El desarrollo de las cepas en el primer medio describió un micelio aéreo abundante de color blanco (Primera fila. Figura 17), que conforme transcurrió el periodo de incubación se tornó verde alrededor del área de inoculación, formando en el centro pústulas de conidiación para cada una de las cepas a excepción de *Th19*, donde, el proceso de conidiación no presentó la formación de dichas estructuras (Figura 17). En cuanto al medio AEβ-G, la sustitución del cereal significó una disminución en la fuente de carbono, razón por la cual el micelio se desarrolló de forma sumergida, translucida, con abundantes pústulas de conidiación a manera de un único anillo concéntrico; así, con el propósito de ratificar si este efecto estaba relacionado con los componentes, se inocularon las cepas en agar bacteriológico (AB) a fin de comparar el crecimiento en ausencia de otra fuente nutricional, evidenciando en el crecimiento un comportamiento difuso con menor índice de esporulación que se presenta en la tercer fila de la Figura 17 (AB), conducta que podría obedecer al agotamiento de las reservas de energía predispuestas en el micelio (Pitson *et al.*, 1993).

Figura 17

*Prueba para la detección cualitativa de glucanasas***.**



Nota. Ensayo cualitativo para la potencial producción de glucanasas 7 días. Fuente: Autor.

Los β-glucanos están constituidos por unidades de glucosa entrelazadas con enlaces glicosídicos, algunas estructuras más simples formadas por un solo enlace y sin ramificaciones son denominadas como β-glucanos no celulolíticos; comúnmente se les encuentra formando parte de las paredes celulares de los hongos como el β-1,3-glucano (Xiao *et al.*, 2023). Enzimas como las glucanasas actúan sobre estas macromoléculas al hidrolizarlas en oligosacáridos o monosacáridos conforme a la actividad endo o exo- β-glucanasas. A nivel biológico se considera que dichas enzimas representan un aporte nutricional importante para hongos micoparasitarios al permitir el ataque de la presa, lisando su pared celular. La expresión de enzimas como las β-1,3-endoglucanasa, β-1,3-exoglucanasa y la β-1,6-endoglucanasa propician el desarrollo del micoparasitismo de especies del género *Trichoderma,* informando principalmente la actividad de las β-1,3 y β-1,6-endoglucanasa en *T. reesei, T. viride, T. virens* y *T. harzianum* (Gao *et al.*, 2021; Nawaz *et al.*, 2023).

En la Tabla 4, se dispone la valoración de la expresión enzimática que, de la misma forma ocupa un rol importante dentro del biocontrol y potenciales servicios ecosistémicos del género; la actividad cualitativa se estableció de acuerdo a una escala del 1 al 5 conforme al grado de visualización de los halos formados respecto a la producción de celulasas, proteasas y amilasas; y en el caso de la amonificación de acuerdo a la coloración rosado leve o intenso del reverso de las colonias (Ver apéndice H).

Tabla 4

Actividad enzimática registrada por las cepas.

Cepa	Celulasas	Proteasas	Amilasas	Amonificación	Nitrificación
Th2	+/1	+/1	+/4	+/3	+
Th4	+/3	+/2	+/3	+/4	+
Th5	+/2	+/3	+/2	+/3	+
Th12	+/5	+/5	+/5	+/3	+
Th14	+/5	+/3	-	+/1	+
Th19	+/4	+/4	-	+/5	+

Nota. La valoración de la actividad enzimática tuvo en cuenta una calificación entre 1-5, denotando con 5 el mayor grado de expresión cualitativa. Fuente: Autor.

Con lo anterior se evidenció que las cepas *Th12*, *Th14* y *Th19* presentaron un mayor grado de expresión para celulasas y proteasas, resaltando un elevado índice de síntesis de amilasas para la primera de estas. En relación a la capacidad amonificante, las cepas exhiben una hidrolisis lenta de urea; además, de ostentar un potencial como organismos nitrificantes.

La celulosa es un componente estructural de plantas y algas, en la que la glucosa está unida mediante enlaces β-1,4 y rodeada de polisacáridos hemicelulósicos unidos a ella por puentes de hidrogeno, otorgándole de esta forma resistencia frente a la hidrolización química o biológica; no obstante, enzimas habitualmente conocidas como celulasas tienen la capacidad de escindir el enlace glucosídico. Dentro de todas las actividades enzimáticas descritas en *Trichoderma* spp., la producción de celulasas es la más estudiada, hasta el punto de mejorar la producción de la enzima en la especie *T. reesei* para uso industrial (Andrade *et al.*, 2023). Sin embargo, se ha determinado que la expresión de celulasas en este género puede favorecer dos procesos, por una parte, son útiles para el establecimiento de la interacción simbiótica del organismo con las plantas al favorecer el ingreso a la raíz, situación en la que la actividad de la enzima debe ser limitada; en segundo lugar, las celulasas promueven la degradación de Hongos Fitopatógenos (HFP), proceso que ha sido informado en *T. longibrachiatum, T.viride, T. asperellum* y *T. brevicompactum* (Gutiérrez *et al.*, 2015; Mukherjee *et al.*, 2022)

Además de las quitinasas y glucanasas cuya expresión está fuertemente relacionada con las estrategias de micoparasitismo en *Trichoderma* spp., las proteasas representan una actividad significativa dentro del proceso de degradación que, por otro lado, están involucradas en la inhibición enzimática patogénica de HFP (Deng *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2023); esta última actividad ha sido descrita en especies como *T. virens, T. atroviride, T. harzianum* y *T. reesei* (Mukherjee *et al.*, 2022).

Igualmente, se ha asignado un papel lítico a las amilasas dentro del comportamiento parasitario de *Trichoderma* spp. aunque no se considera sustancial en *T. harzianum* de acuerdo con De Azevedo *et al.* (2000**).** La síntesis de esta enzima ha sido registrada en pocas especies, tal es el caso de *T. pseudokoningii* y *T. viride* (Abdulaal, 2018; Mahmood & Rahman, 2008). Por otra parte,

las cepas evaluadas evidenciaron una degradación lenta de urea y desarrollo sobre agar amonio, pese a que en este último el micelio aéreo fuera ausente. La caracterización de dichas actividades permite prever el potencial de las cepas en primer lugar como agentes que participan en la amonificación, proceso que es llevado a cabo por microrganismos que habitan el suelo y median la mineralización de moléculas orgánicas conformadas por aminas o amidas como la urea, con el propósito de generar amonio (Fath, 2019). En segundo lugar, se destaca la capacidad nitrificante, donde, las cepas consiguen la transformación del amonio en nitrato que en condiciones normales podría ser asimilado en cultivos (Li *et al.*, 2023). Tanto el amonio como el nitrato generado por *Trichoderma* spp. proporciona formas orgánicas de nitrógeno que son aprovechables dentro del metabolismo de las plantas, favoreciendo por ejemplo la producción de aminoácidos y el proceso de fotosíntesis, promoviendo a grandes rasgo mejoras en el crecimiento (Antúnez *et al*., 2014). Aunque la información respecto a estos procesos en *Trichoderma* spp. es escasa, recientemente la amonificación fue descrita por Baazeem *et al.* (2021) en *T. hamatum,* señalando además la importancia de las ureasas dentro de la recircularizacion de los nutrientes. Por su parte, Wu *et al.* (2022) describieron la importancia del potencial nitrificante del género dentro de la solubilización de requerimientos nutricionales, así como el biocontrol e inducción de resistencia en los cultivos; estos autores enfatizan en la posibilidad de implementar biofertilizantes usando *T. asperellum* como organismo inhibidor del N_20 para promover una agricultura libre de emisiones de gases de efecto invernadero (Gao *et al.*, 2023).

Actividad antagónica *in-vitro* frente a *Fusarium* spp. y *Botrytis* spp.

La capacidad antagónica de los aislados se determinó considerando aspectos como las estrategias de micoparasitismo, nivel de invasión y competencia por nutrientes, comparando para

el primer factor las estructuras comúnmente desarrolladas por los patógenos vegetales en PDA (ver Apéndice Figura I1-I2).

En general, al realizar los cultivos duales la interacción antagonista-fitopatógeno inició entorno al cuarto día, donde, las observaciones permitieron indicar que visualmente el micelio del antagonista se vuelve menos compacto en la medida en que este se acerca o crece sobre el HFP. Por su parte, con respecto al comportamiento de las cepas en el AES (Agar Extracto de Suelo), estas desarrollaron micelio sumergido que en su mayoría formó pústulas de conidiación a partir del día 4, por lo que las mediciones del crecimiento radial no se tomaron en cuenta para la determinación del PICR; el incremento de radial de los testigos sobre el medio mencionado varió en los patógenos de plantas en relación al crecimiento descrito en PDA, por consiguiente, *Fusarium* spp. logró un mejor avance en dicho medio, mientras que en el caso de *Botrytis* spp. el crecimiento en el AES se redujo (ver Apéndice I3).

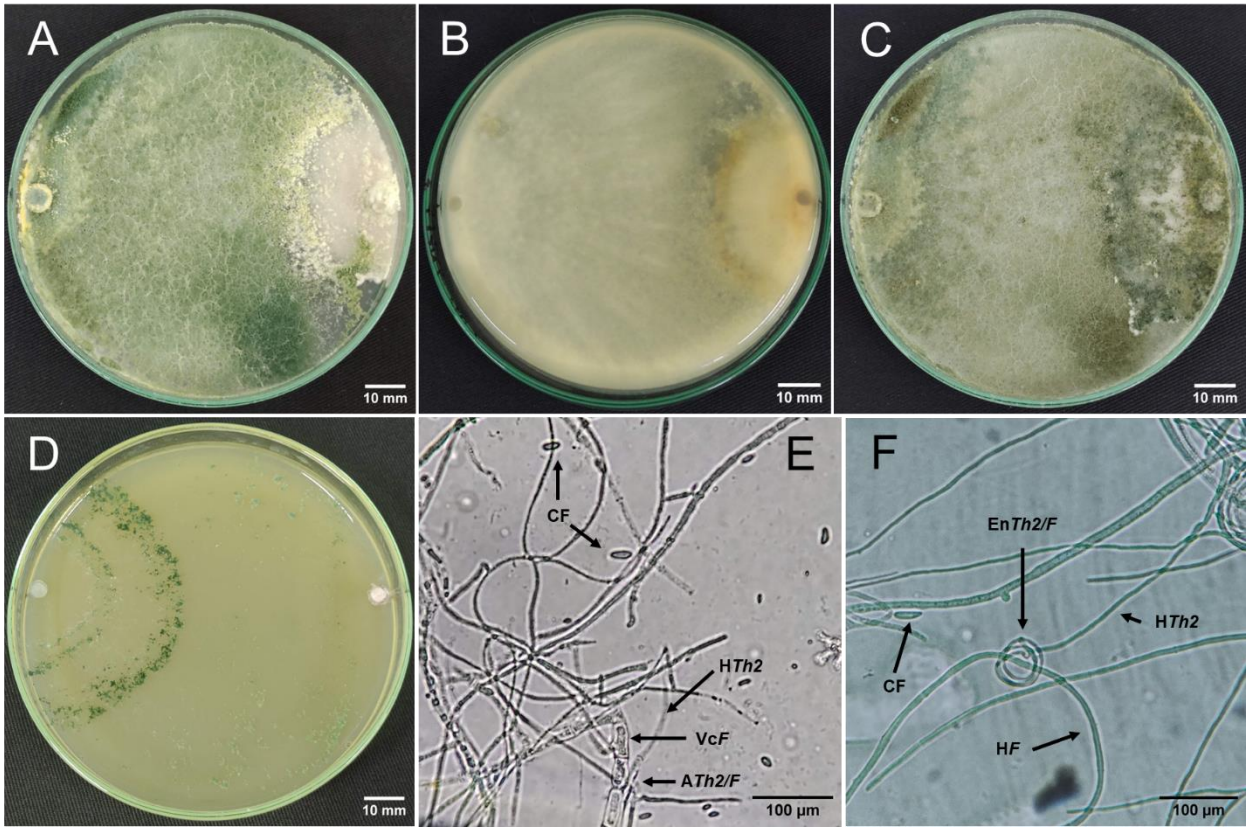
***Antagonismo in-vitro frente a Fusarium* spp.**

Th2 detuvo el crecimiento de *Fusarium* spp. para el quinto día del ensayo, momento a partir del cual *Trichoderma* spp. continuó acercándose al fitopatógeno hasta el punto de comenzar a crecer sobre este, iniciando la esporulación en su superficie para el noveno día. Conforme a la Figura 18, *Th2* logró desarrollarse y esporular hasta cubrir la totalmente el micelio del patógeno, completando este proceso para el día 15. En el apartado referente al crecimiento en AES, esta cepa formó dos anillos concéntricos conformados por pústulas de conidiación, seguidos de micelio sumergido que se desplegó hasta el extremo en donde se dispuso el patógeno, la formación de pústulas de conidiación en dicha zona evidenció nuevamente la capacidad del aislado para invadir el espacio ocupado por el HFP. Microscópicamente dentro de las estrategias de micoparasitismo

destacó el enrollamiento y adhesión de las hifas de *Th2* a las del fitopatógeno, estableciendo una posible vacuolización citoplasmática de este.

Figura 18

Ensayo antagónico, Th2 contra Fusarium spp.



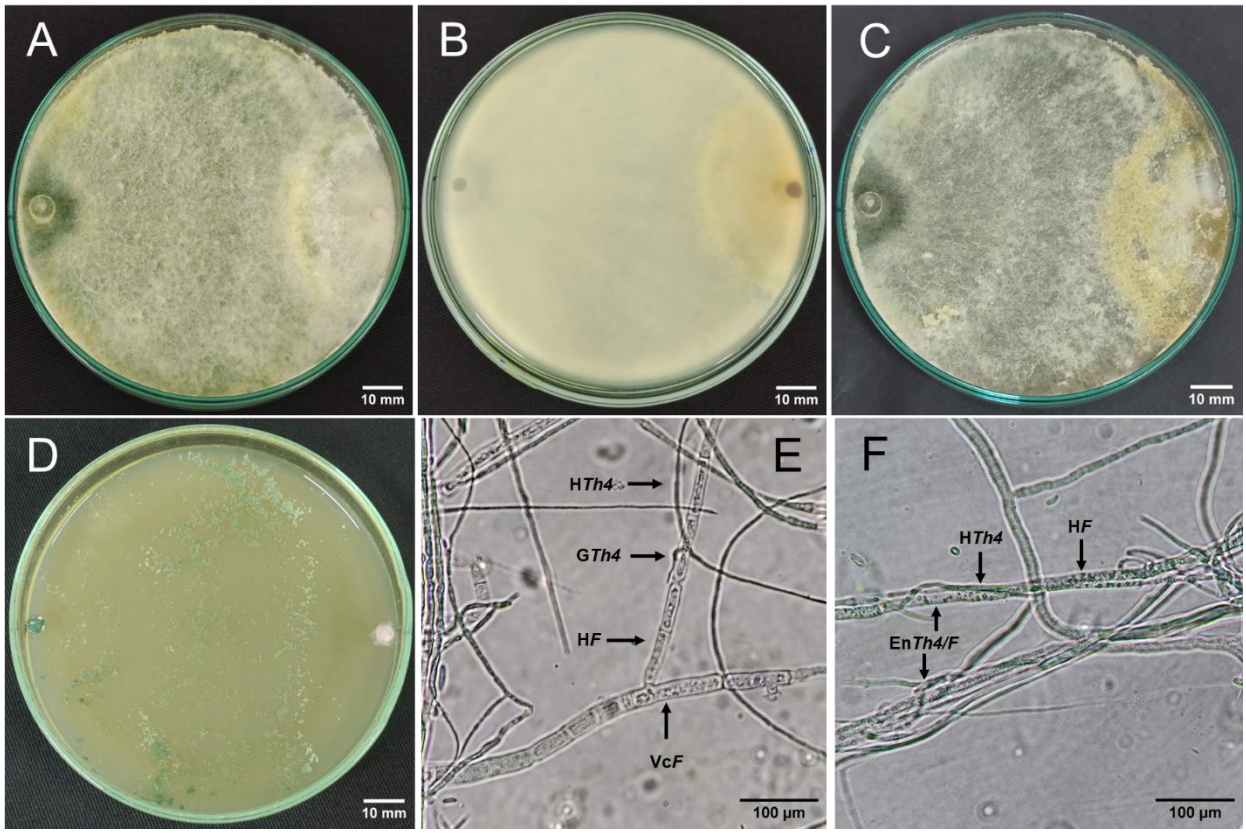
Nota. Cultivo dual *Th2* (izquierda)-*Fusarium* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 10 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 10 días; C. Enfrentamiento PDA, 15 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. La adhesión de las hifas de *Th2* a las de *Fusarium* spp. (A*Th2/F*) provocó la vacuolización del citoplasma del HFP (Vc*F*); F. Enrollamiento de *Th2* sobre la hifa del HFP (En*Th2/F*). C*F*: Conidios *Fusarium* spp.; H*Th2*: Hifa *Th2*. Fuente: Autor.

La extensión del crecimiento de *Fusarium* spp. fue obstaculizada por *Th4* en el sexto día, iniciando para el día 9 el proceso de conidiación en una tonalidad amarilla en el punto de interacción; resaltando la esporulación amarilla del antagonista que recubrió el micelio del fitopatógeno al culminar el día 15 (Figura 19). Aunque el desarrollo de pústulas en el medio AES

fue difuso, muchas de estas se situaron cerca del patógeno y otras sobre el micelio translucido de este, considerando que su radio de crecimiento se estableció en aproximadamente 32 mm. En cuanto al micoparasitismo, *Th4* se aferra a las hifas del HFP mediante el desarrollo de estructuras comúnmente denominadas como ganchos provocando una vacuolización citoplasmática, observando además el enrollamiento del antagonista sobre el patógeno vegetal.

Figura 19

Ensayo antagónico, Th4 contra Fusarium spp.

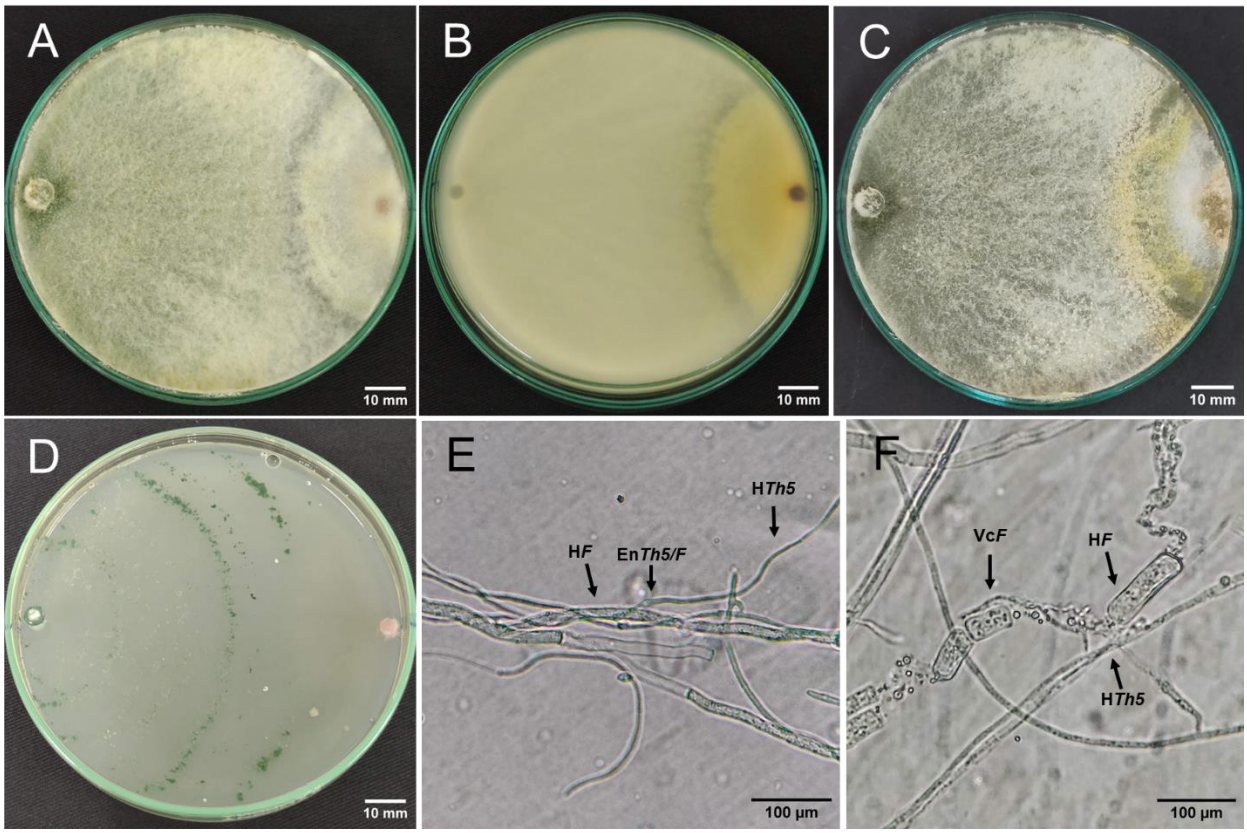


Nota. Cultivo dual *Th4* (izquierda)-*Fusarium* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 10 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 10 días; C. Enfrentamiento PDA, 15 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. Gancho de *Trichoderma* spp. sobre la hifa del fitopatógeno (G*Th4*) y vacuolización del citoplasma (Vc*F*); F. Enrollamiento del antagonista sobre el HFP (En*Th4/F*). H*F*: Hifa *Fusarium* spp.; H*Th4*: Hifa *Th4*. Fuente: Autor.

Por su parte, *Th5* contuvo el crecimiento del fitopatógeno regularmente para el día 5, desarrollando una tenue esporulación sobre él que se intensificó hacia el día 15 en tonalidad amarilla (Figura 20); en AES se definieron tres anillos concéntricos de pústulas de conidiación, donde, el último fue interrumpido por el crecimiento radial alcanzado por *Fusarium* spp.; *Th5* emplea como estrategia de parasitismo el reconocimiento y posterior enrollamiento en las hifas del patógeno vegetal, que el ultimas genera el debilitamiento de las paredes celulares y favorece una potencial lisis.

Figura 20

Ensayo antagónico, Th5 contra Fusarium spp.

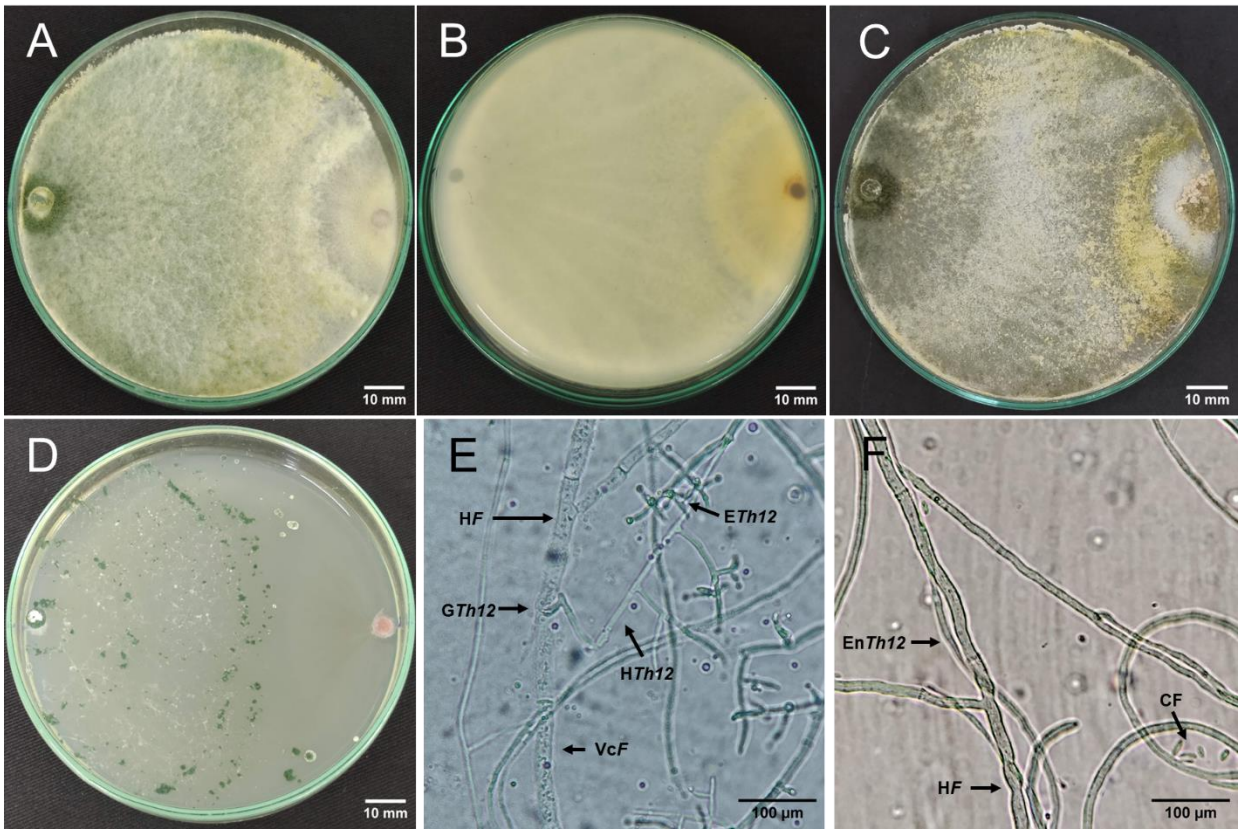


Nota. Cultivo dual *Th5* (izquierda)-*Fusarium* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 10 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 10 días; C. Enfrentamiento PDA, 15 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. Enrollamiento sobre el fitopatógeno (En*Th5/F*); F. Vacuolización citoplasmática del HFP. H*F:* Hifa *Fusarium* spp.; H*Th5:* Hifa *Th5*. Fuente: Autor.

El comportamiento descrito por *Th12* indicó la capacidad para detener el crecimiento de HFP al terminar el sexto día, cinco días después de esto comenzó a esporular sobre este pasando de una tonalidad verde a amarilla que fue más notable para el día 15 (Figura 21), abarcando una mayor zona de intervención sobre el micelio del patógeno; referente al comportamiento en AES, no fue evidente la formación de pústulas de conidiación en el extremo del fitopatógeno. *Th12* demostró la formación de ganchos que le permitieron anclarse las hifas de *Fusarium* spp., así mismo se identificó el enrollamiento sobre sus hifas.

Figura 21

Ensayo antagónico, Th12 contra Fusarium spp.

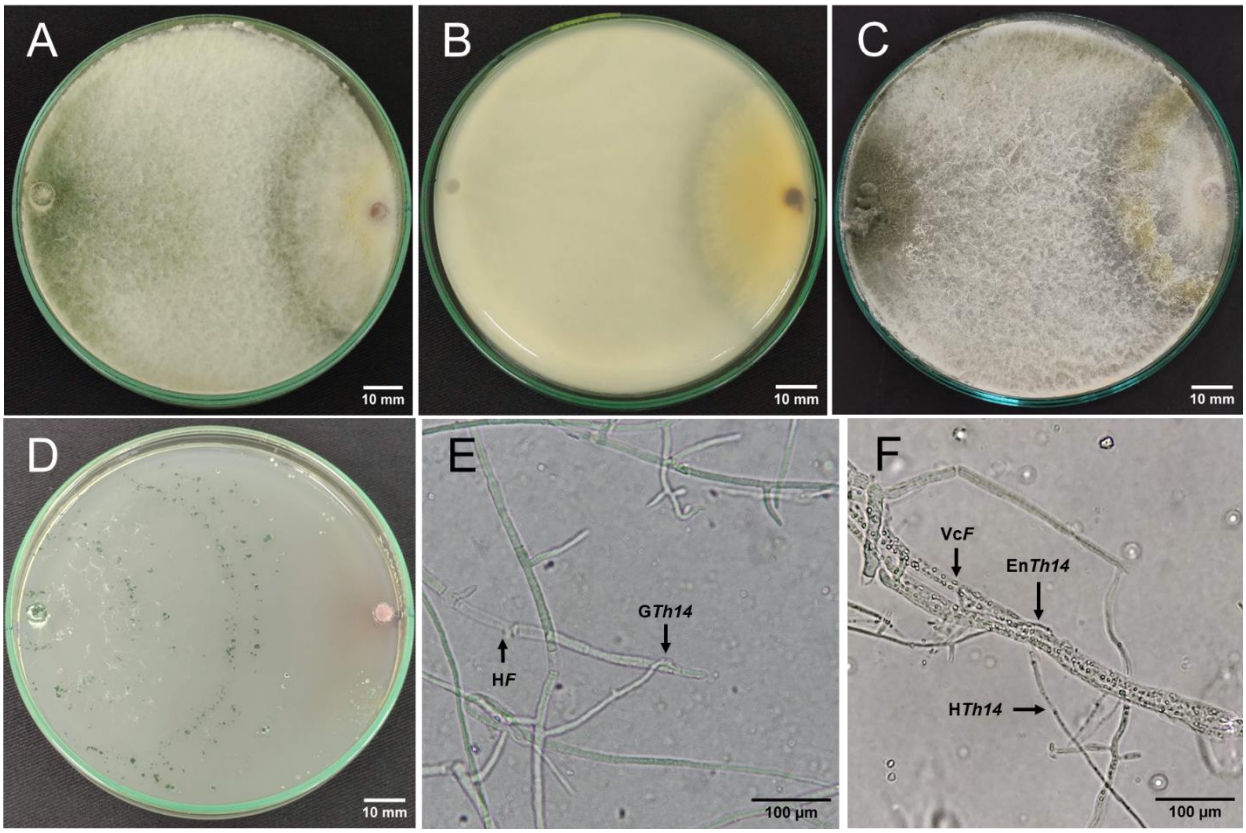


Nota. Cultivo dual *Th12* (izquierda)-*Fusarium* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 10 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 10 días; C. Enfrentamiento PDA, 15 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. Gancho del antagonista sobre la hifa de HFP (G*Th12*) y vacuolización citoplasmática (Vc*F*); F. Enrollamiento sobre el fitopatógeno (En*Th12/F*). H*F*: Hifa *Fusarium* spp.; H*Th12:* Hifa *Th12;* E*Th12:* Estructura *Trichoderma* spp.*;* C*F*: Conidios *Fusarium* spp. Fuente: Autor.

La interrupción del crecimiento de *Fusarium* spp. por parte de la cepa *Th14* se estimó entre el sexto día, momento para el cuál se hizo evidente un mayor surco de separación comparado con el desarrollado por los demás aislados, zona a partir de la cual el micelio del antagonista se hace difuso. En este caso, la esporulación fue mayor en el inoculo inicial y el punto de interacción antagonista-fitopatógeno, encontrando una franja verde que se torna amarilla directamente en la superficie del micelio del HFP (Figura 22), también fue evidente la esporulación del antagonista sobre este en AES, al desarrollar pústulas de conidiación en el espacio ocupado por su micelio. Del mismo modo, microscópicamente el accionar del *Th14* sobre las hifas de *Fusarium* spp. fue la aprehensión por medio de ganchos y enrollamiento.

Figura 22

Ensayo antagónico, Th14 contra Fusarium spp.

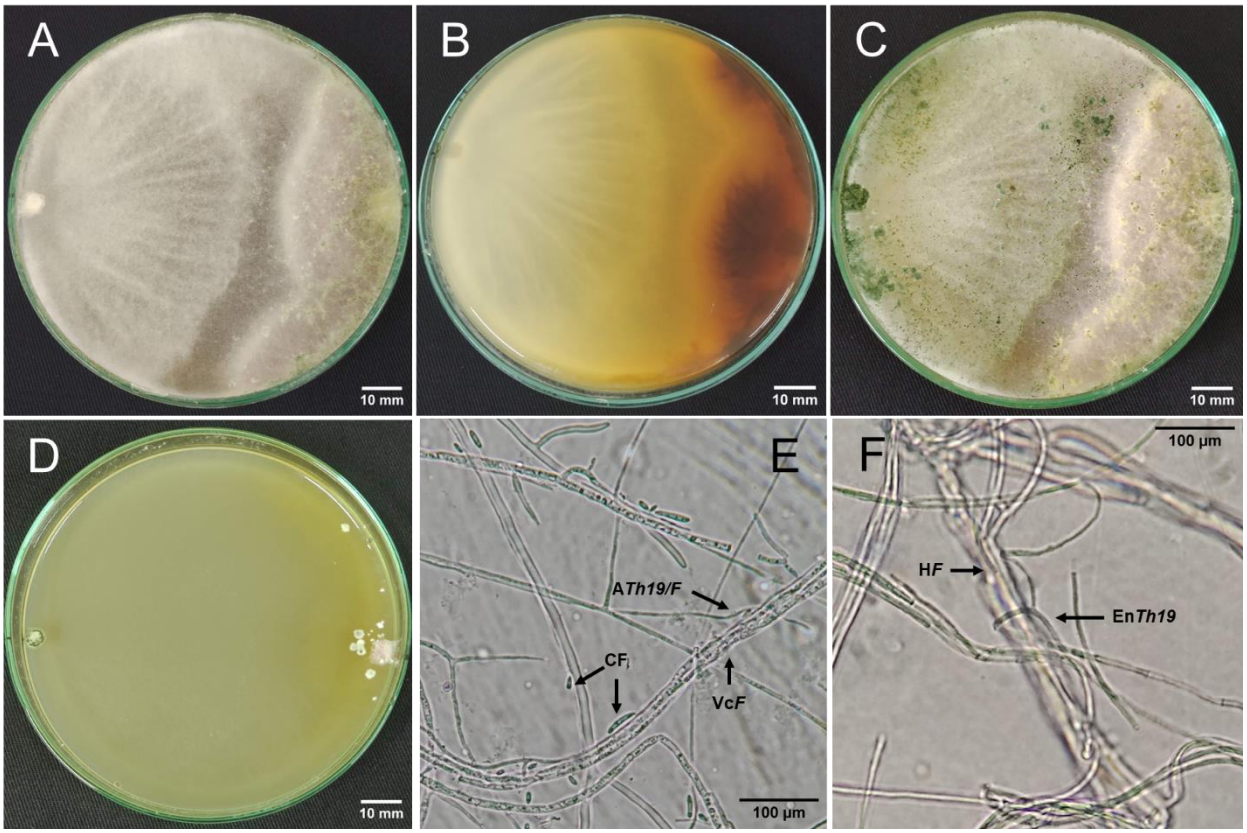


Nota. Cultivo dual *Th14* (izquierda)-*Fusarium* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 10 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 10 días; C. Enfrentamiento PDA, 15 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. Gancho del antagonista sobre la hifa de HFP (G*Th14*); F. Enrollamiento sobre el HFP (En*Th14/F*) y vacuolización citoplasmática (Vc*F*). H*F*: Hifa *Fusarium* spp.; H*Th14:* Hifa *Th14.* Fuente: Autor.

Th19 describió una conducta notablemente diferencial en el cultivo dual con *Fusarium* spp., resaltando que al ser una cepa de crecimiento relativamente lento permitió que el fitopatógeno extendiera su crecimiento radial hasta el séptimo día, momento en el que se dio inicio a la interacción antagonista-fitopatógeno; no obstante, aun sin esporular directamente en la superficie de sí mismo, *Th19* comenzó este proceso en primer lugar sobre el micelio del HFP como se evidencia en la Figura 23.

Figura 23

Ensayo antagónico, Th19 contra Fusarium spp.



Nota. Cultivo dual *Th19* (izquierda)-*Fusarium* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 7 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 7 días; C. Enfrentamiento PDA, 10 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. Adhesión del antagonista sobre el HFP (A*Th19/F*) y vacuolización citoplasmática (Vc*F*); F. Enrollamiento del antagonista sobre el fitopatógeno (En*Th19*). C*F*: Conidios *Fusarium* spp.*; HF*: Hifa *Fusarium* spp. Fuente: Autor.

La conidiación completa por la anterior cepa se alcanzó después de diez días; resaltando que el desarrollo del fitopatógeno no fue uniforme, sino que por el contrario se extendió hacia el borde superior e inferior de la caja de Petri. La síntesis de pigmento característico de esta cepa de *Trichoderma* spp. podría estar implicada como un mecanismo de antibiosis, lo anterior debido a que en primera instancia para el quinto día se observó un surco de inhibición que separaba los extremos del crecimiento radial del antagonista y el fitopatógeno, zona en la que posteriormente *Th19* desarrolló un crecimiento difuso hasta cubrir el micelio de *Fusarium* spp., acentuando a su

vez la coloración del pigmento a medida en que se acercaba al patógeno vegetal (Figura 23-B); cabe recalcar que solo bajo la presencia de *Th19, Fusarium* spp. produjo un pigmento en el reverso de la colonia de tonalidad violácea; igualmente, en el medio alternativo (AES) se indicó la formación de pústulas de conidiación sobre el crecimiento radial del fitopatógeno (CRF), además de ser evidente la producción de pigmento en el área de inoculación de este. En cuanto a las apreciaciones microscópicas, esta cepa antagónica se adhiere y enrolla al fitopatógeno, causando de forma presumible la vacuolización de su citoplasma.

Las descripciones presentadas evidencian de ante mano el micoparasitismo y la forma en la que cada cepa invade el crecimiento radial de *Fusarium* spp., apreciaciones que pueden considerarse como mecanismos de acción directa; no obstante, la competencia por nutrientes y por ende de espacio, fue ratificada al contrastar las VCR y los valores radiales de crecimiento, en el primer caso las VCR en PDA de los testigos con respecto a los valores estimados para cada antagonista en el mismo medio; comparando además el avance radial diario del antagonista y fitopatógeno en los cultivos duales.

Las velocidades de crecimiento radial registradas para los controles del fitopatógeno y los antagonistas se disponen en la Tabla 5, donde, los valores estimados para los seis antagonistas superan en casi tres veces la VCR de *Fusarium* spp. (p=0,0008), las diferencias significativas (Apéndice Tabla I1) permite determinar de manera preliminar que en efecto existiría una competencia por nutrientes y espacio dado que *Trichoderma* spp. se desarrolla a una mayor velocidad que el patógeno.

Tabla 5

Relación VCR estimadas con Fusarium spp.

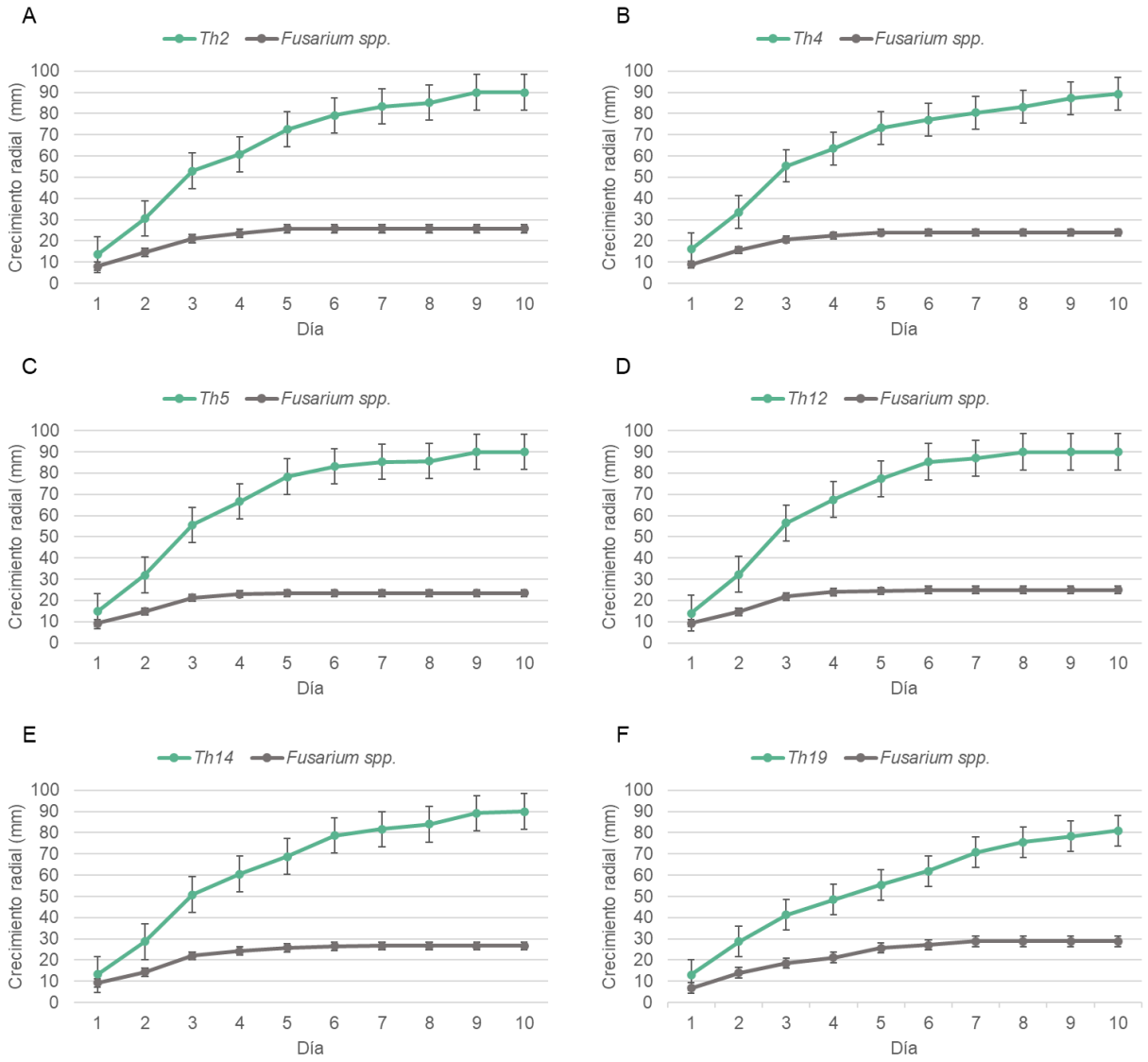
Cepa	Velocidad de crecimiento radial (mm/h)
Fusarium spp.	0,27
Th2	0,75
Th4	0,70
Th5	0,76
Th12	0,78
Th14	0,72
Th19	0,60

Nota. VCR descritas por las cepas en PDA (LSD, $p<0,05$). Fuente: Autor.

Así mismo, en la Figura 24 es notorio el avance radial diario de todas las cepas de *Trichoderma* spp. con respecto al patógeno ensayado. Sin embargo, en este caso la tasa de crecimiento del HFP solo se mantuvo constante durante los dos primeros días dado que, a partir del siguiente día en la mayoría de ensayos el avance radial se redujo considerablemente hasta el punto de interacción antagonista-fitopatógeno, lo que permitiría inferir que las cepas de *Trichoderma* spp. incorporan nutrientes a una mayor velocidad e incrementa la tasa de metabolismo. Dentro de esta representación gráfica cabe resaltar que la presencia del fitopatógeno si bien, genera un descenso en el crecimiento radial de las cepas hacia el punto de interacción mencionado, no detiene por completo el crecimiento de los antagonistas dado que todos estos alcanzaron los 90 mm de radio u 80 mm para *Th19*.

Figura 24

Crecimiento radial diario en cultivos duales con Fusarium spp.



Nota. Mediciones medias del CR, 10 días para los cultivos duales con *Fusarium* spp. en PDA: A. *Th2*; B. *Th4*; C. *Th5*; D. *Th12*; E. *Th14*; F. *Th19*. Fuente: Autor.

Micoparasitismo y competencia por nutrientes forman parte del mecanismo antagónico de *Trichoderma* spp., en el cual se ha descrito que el proceso se desarrolla siguiendo etapas, así, por ejemplo, se considera que inicialmente en el punto de interacción antagonista-patógeno en primera instancia tiene lugar una etapa de reconocimiento, donde, *Trichoderma* spp. se une a la lectina del

HFP por intervención de hidrofobinas, dando lugar al enrollamiento de las hifas, aquí se da el acople de proteínas transmembranales que promueven la expresión de genes implicados en etapas posteriores; a continuación, el micoparasito forma estructuras denominadas apresorios o ganchos que tienden a ser abultados debido a que, dentro de ellos se acumulan solutos como el glicerol con el propósito de estrujar las hifas de la presa e invadirlas, sin embargo, *Trichoderma* spp. debe valerse de la síntesis de las enzimas de virulencia anteriormente descritas y quitinasas, para proseguir con la degradación de la pared celular del huésped que pierde estructuras vacuoladas, causando finalmente la muerte de este; el éxito en estas etapas también se sustenta en la rápida velocidad de crecimiento de las especies del género dado que al competir por recursos se genera el debilitamiento del patógeno y disminución de su población (Dutta *et al.*, 2023).

En general las cepas analizadas presentaron estrategias de parasitismo similares entre sí; sin embargo, se ha informado la posibilidad de que cada especie desarrolle un mecanismo diferente, indicando que *T. atroviride* experimenta un control positivo para la síntesis de metabolitos además de las enzimas; para *T. reesei* se incrementa la concentración de celulasas y sintetiza además hemicelulasas, y en *T. virens* parece ser necesaria la síntesis de gliotoxinas (Atanasova *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2022).

El micoparatisimo de *Trichoderma* spp. exhibido frente a *Fusarium* spp. ha sido registrado en *T. brevicompactum* al sintetizar enzimas hidrolíticas que degradaron la estructura de *F. oxysporum* (Huang *et al.*, 2021). Sui *et al.* (2022) y Andrade *et al.* (2023) citan la habilidad de depredación de *Trichoderma* spp. en otras especies como *F. solani F. culmorum y F. pseudograminearum,* por su parte, Baazeem *et al.* (2021) menciona a *T. harzianum , T. atroviride* y *T. longibrachiatum* como potentes inhibidores de la síntesis de micotoxinas en *Fusarium* spp. que de acuerdo a Prashanth *et al.* (2023) estaría indicado por la competencia de nutrientes y

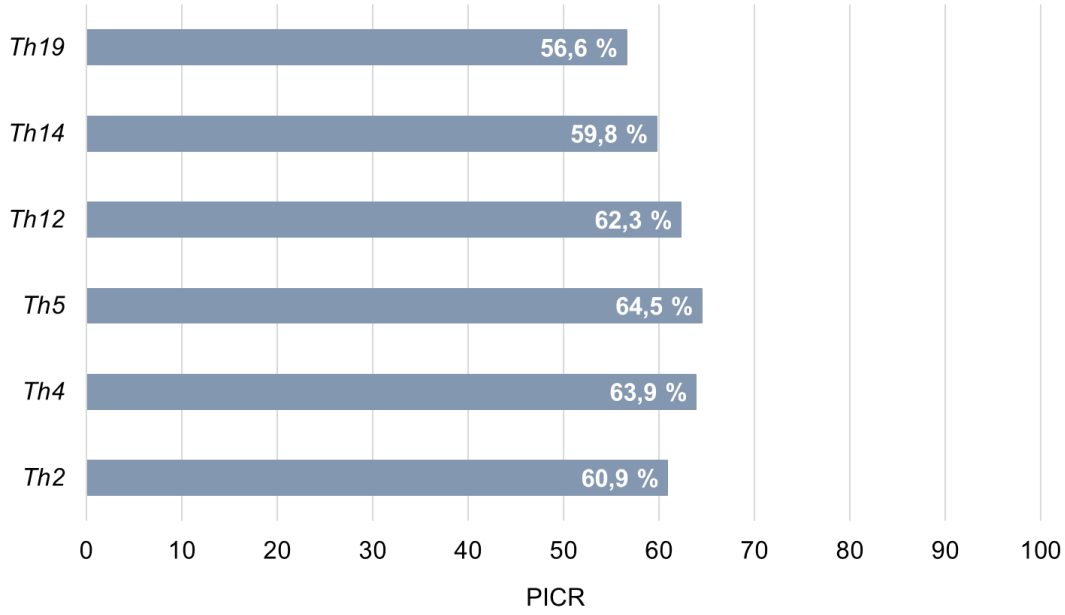
antibiosis. También se ha evidenciado que la competencia por nutrientes mitiga el desarrollo de *F. graminearum* mediante la actividad de enzimas como la reductasa férrica sintetizada por *T. gamsii* al favorecer una mejor captación de hierro relacionada con el área que abarca su micelio (Zapparata *et al.*, 2021).

Estimación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de *Fusarium* spp. Para la valoración del PICR fue necesario tomar en cuenta las mediciones de los radios de crecimiento final del fitopatógeno en cada uno de los cultivos duales, así como el crecimiento radial de este en el testigo para el décimo día (Rodríguez & Wang, 2020).

En la figura 25 se presentan los porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* spp. alcanzados por cada una de las cepas de *Trichoderma* spp. (*Th19, Th14, Th12*, *Th5, Th4, Th2*).

Figura 25

PICR de Fusarium spp. *conseguido por las cepas de Trichoderma* spp.



Nota. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium* spp. (PICR) alcanzados por las cepas de *Trichoderma* spp. para el día 10 (LSD, p<0,05). Fuente: Autor.

La anterior figura dejo percibir que la inhibición en general es mayor al 50 %. Se registraron porcentajes máximos de inhibición para *Th5*, *Th4* y *Th12* del 64,5 %, 63,9 % y 62,3 % respectivamente; sin embargo, no se considera que exista una variación relevante con los porcentajes obtenidos por *Th2* y *Th14* (ver Apéndice Tabla I2). Aunque se supone una cercanía entre los seis valores de PICR, existe una diferencia significativa con respecto al valor estimado para *Th19* en contraste con los valores máximos (p=0,0499), indicando de esta manera que la cepa inhibe el CRF en menor medida.

Esta capacidad para inhibir el crecimiento radial de *Fusarium* spp. se ha descrito en *T. atroviride* en un 92,11 % por Nofal *et al.* (2021), quien además determinó el PICR de tres aislados no identificados cuyos valores fueron cercanos a los estimados en las cepas nativas evaluadas, ordenados de manera descendente 67,88 %, 67,41 % y 52,58 %. Leal *et al.* (2021), informaron un

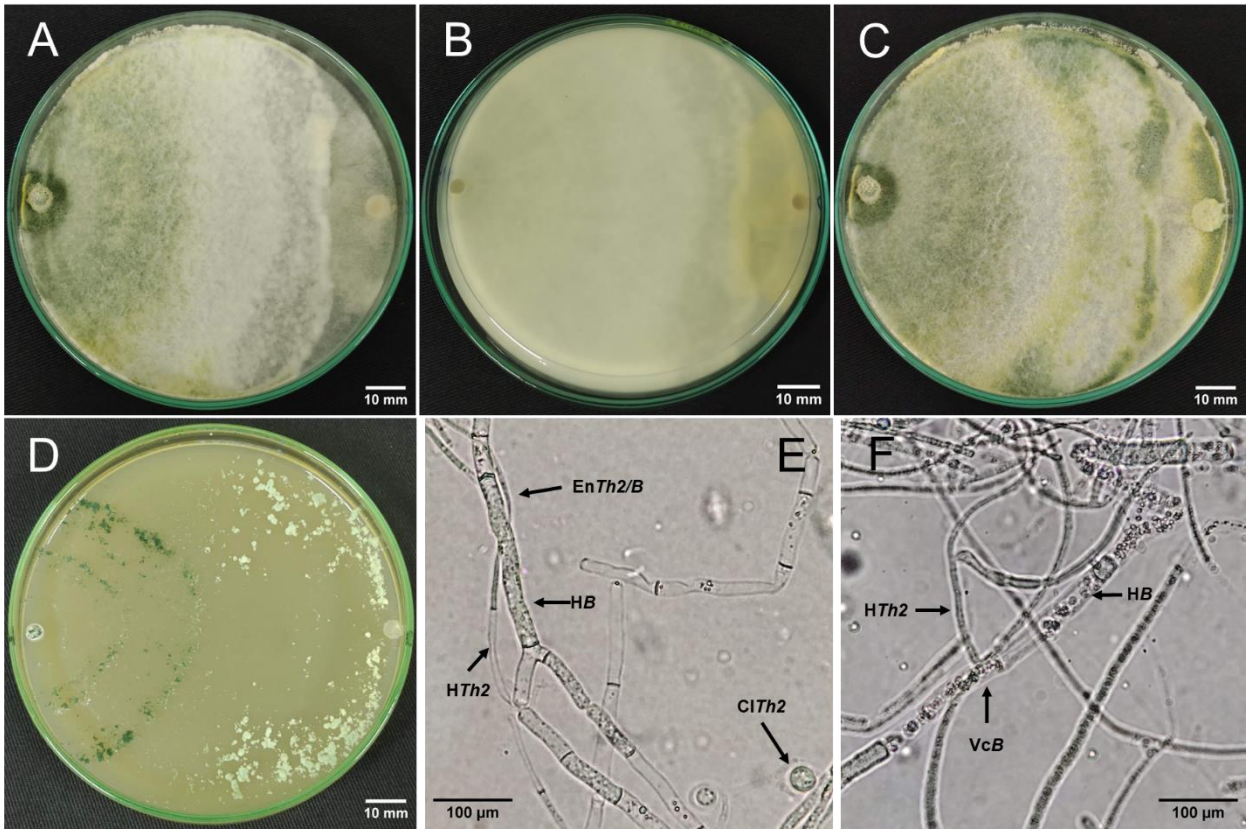
62 % de inhibición del patógeno para dos cepas de *T. asperellum,* sin embargo, su análisis estableció que un aislado logró una mayor inhibición del 64 %, indicando que es un valor significativamente mayor al anterior; así mismo, se identificó la capacidad de imbibición de *F. oxysporum* por parte de *T. atroviride* en un 71,25 % en estudios realizados por Yogalakshmi *et al.* (2021).

***Antagonismo in-vitro frente a Botrytis* spp.**

Botrytis spp. detuvo su crecimiento al enfrentarse a *Th2* para el cuarto día, desde allí este *Trichoderma* spp. continuó desarrollando su micelio sobre el del patógeno, esporulando en él a partir del octavo día y finalizando este proceso al día 10 a manera de anillos concéntricos; en el AES la disposición de las pústulas de conidiación en los primeros días indicó la formación de dos anillos concéntricos, luego de ellos la distribución de las pústulas deja de ser uniforme hasta alcanzar la superficie del CRF (Figura 26). Por otra parte, el micoparasitismo evidenciado fue el enrollamiento de las hifas del fitopatógeno (*EnTh2/B)* y vacuolización citoplasmática, además vale la pena mencionar que no se encontraron esporas de este, pero si clamidosporas del antagonista.

Figura 26

Ensayo antagónico, Th2 contra Botrytis spp.

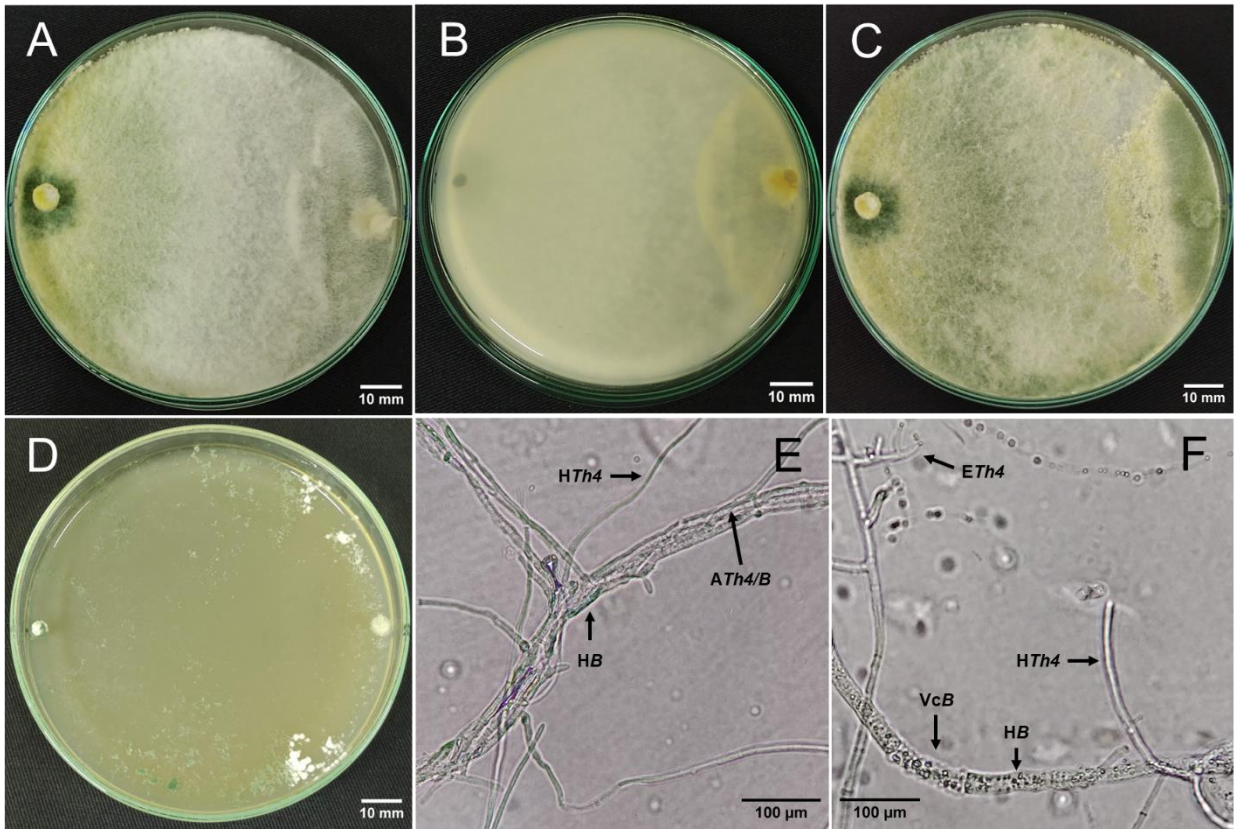


Nota. Cultivo dual *Th2* (izquierda)-*Botrytis* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 7 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 7 días; C. Enfrentamiento PDA, 10 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. Enrollamiento (En*Th2/B*), presencia de clamidosporas (Cl*Th2*); F. vacuolización de *Botrytis* spp. (Vc*B*). H*B:* Hifa *Botrytis* spp.; H*Th2:* Hifa *Th2.* Fuente: Autor.

Th4 demostró un comportamiento semejante, llegando al borde del crecimiento del patógeno para el quinto día, esporulando en mayor medida sobre su micelio en una tonalidad verde al día 10; dicha esporulación también destacó sobre la superficie del fitopatógeno en el AES (Figura 27). Como medida de micoparasitismo, *Th4* logra adherirse y generar la vacuolización del citoplasma del HFP; en las microscopias se apreciaron estructuras pertenecientes a conidióforos del antagonista, pero no esporas o conidióforos del fitopatógeno.

Figura 27

Ensayo antagónico, Th4 contra Botrytis spp.

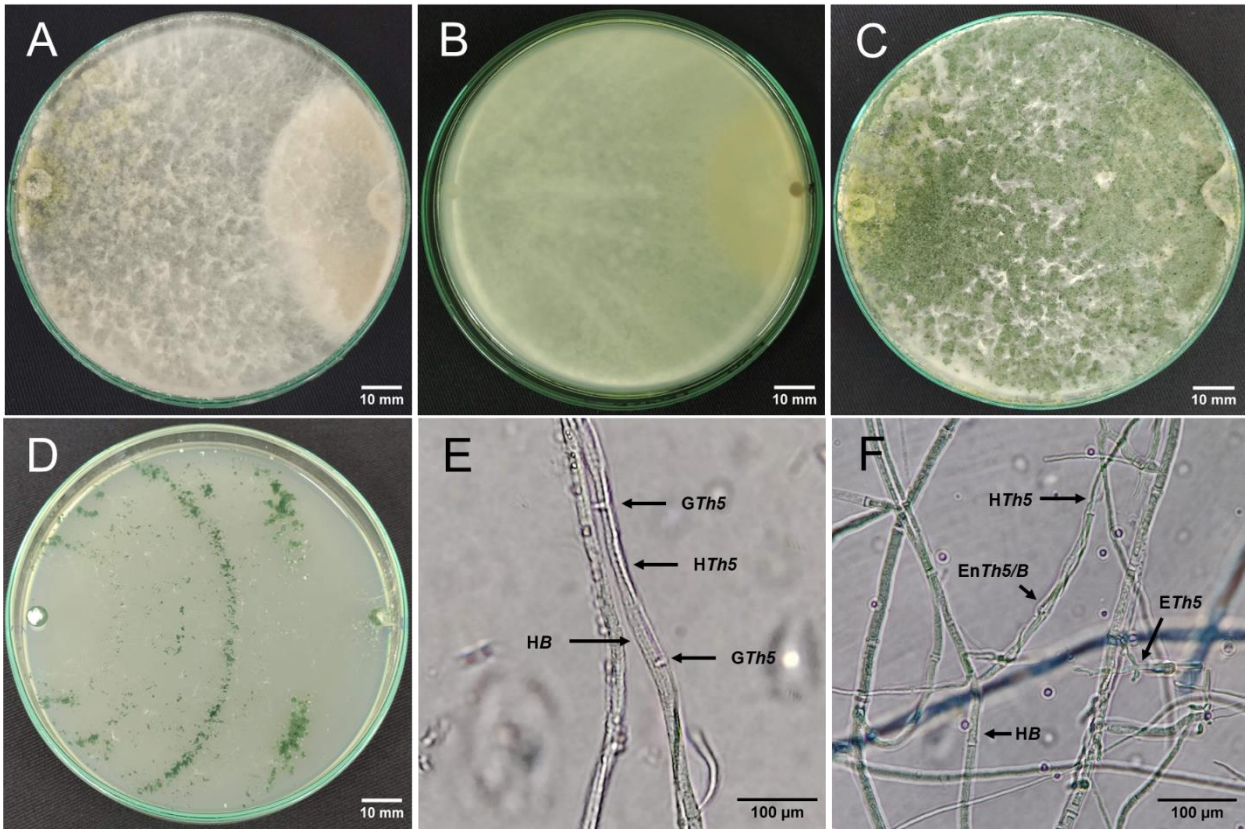


Nota. Cultivo dual *Th4* (izquierda)-*Botrytis* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 7 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 7 días; C. Enfrentamiento PDA, 10 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. Adhesión de las hifas del antagonista sobre las del HFP (A*Th4/B*); F. Vacuolización del citoplasma del HFP (Vc*B*). H*B:* Hifa *Botrytis* spp.; H*Th4:* Hifa *Th4;* E*Th4*: Estructura *Th4.* Fuente: Autor.

Por su lado, *Th5* contuvo el avance del fitopatógeno hacia el sexto día; para el décimo día de ensayo esta cepa esporuló totalmente sobre sí misma y continuó el crecimiento en la superficie del patógeno, alcanzando la esporulación completa en torno al día 15 (Figura 28). En el AES se establecieron las pústulas en cuatro anillos concéntricos, el último de ellos parece ser interrumpido por el CRF, sin embargo, es notable la esporulación de la cepa de *Trichoderma* spp. directamente sobre el disco de inoculación de *Botrytis* spp.; *Th5* parasita este HFP al adherirse y enrollarse, se reitera la presencia de estructuras correspondientes al antagonista.

Figura 28

Ensayo antagónico, Th5 contra Botrytis spp.

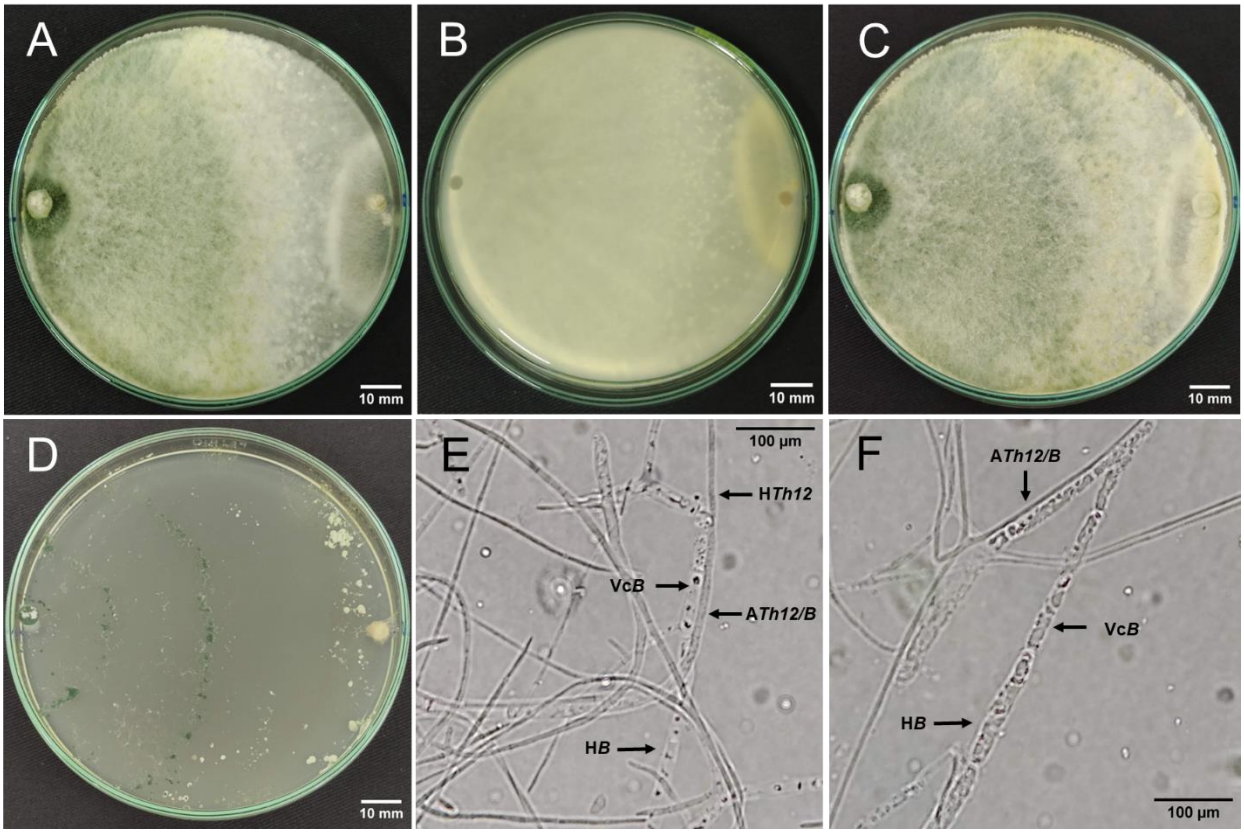


Nota. Cultivo dual *Th5* (izquierda)-*Botrytis* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 10 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 10 días; C. Enfrentamiento PDA, 15 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. Formación de ganchos sobre la hifa de HFP (G*Th5*); F. Enrollamiento sobre el fitopatógeno (En*Th5/B*). H*B*: Hifa *Botrytis* spp.; H*Th5:* Hifa *Th5;* E*Th5:* Estructura *Trichoderma* spp. Fuente: Autor.

Th12 nuevamente detiene el CRF al quinto día y desarrolla una esporulación amarillenta sobre el micelio de este para el día 10 (Figura 29), esporulación que también tuvo lugar en el área de crecimiento del fitopatógeno en el AES. El ataque del antagonista sobre el fitopatógeno esta mediado por el acercamiento y adhesión del primero hacia el segundo, generando posteriormente una alteración en la estructura de sus hifas.

Figura 29

Ensayo antagónico, Th12 contra Botrytis spp.

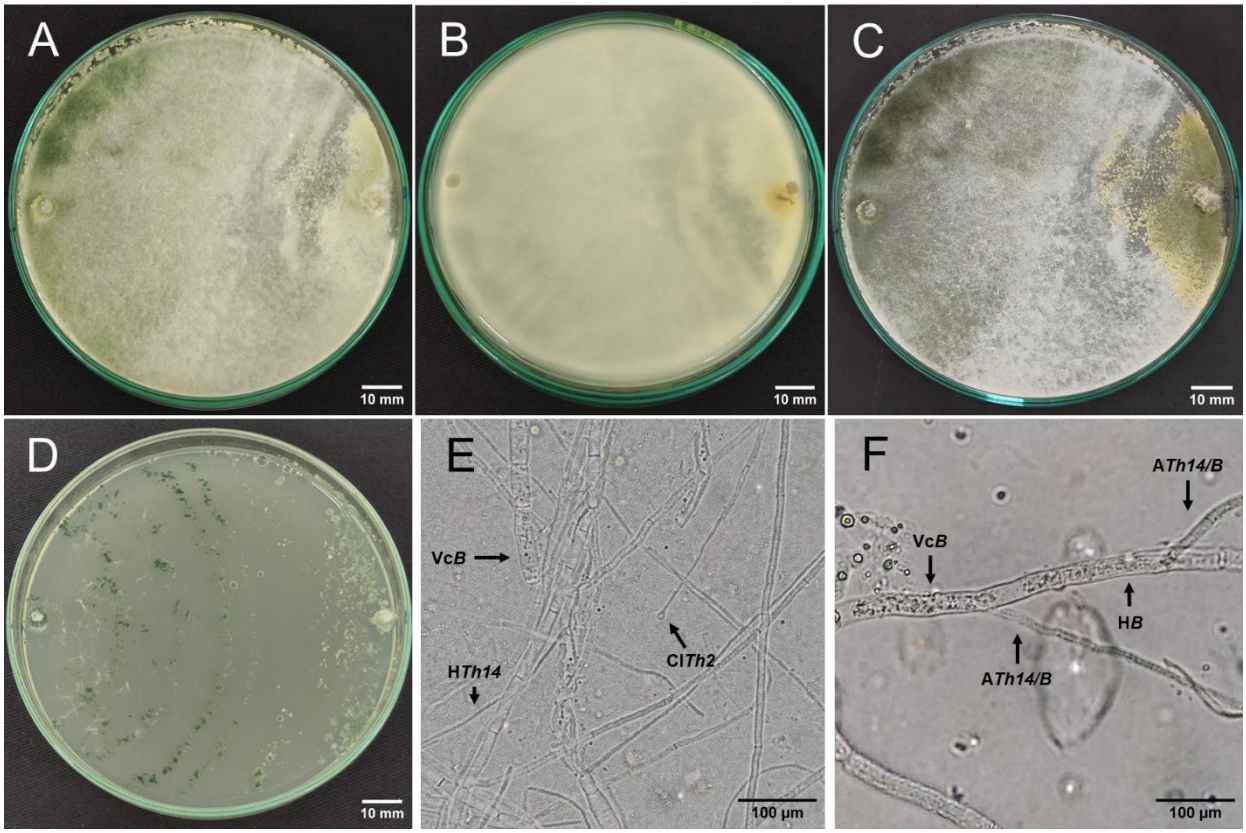


Nota. Cultivo dual *Th12* (izquierda)-*Botrytis* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 7 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 7 días; C. Enfrentamiento PDA, 10 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E-F. Adhesión del antagonista sobre el HFP (A*Th12/B*) y vacuolización de su citoplasma (Vc*B*). H*B*: Hifa *Botrytis* spp.; H*Th12:* Hifa *Th12.* Fuente: Autor.

De igual manera, *Th14* estancó el crecimiento radial de este patógeno vegetal para el quinto día de ensayo, completando el crecimiento y conidiación amarillenta sobre este; sin embargo, para el día 15 el color de la esporulación se tornó verde (Figura 30). Sobre el AES en principio la distribución de las pústulas de conidiación se dio a manera de delgados anillos concéntricos, encontrando que para el décimo día las pústulas se esparcieron hacia el CRF. Como estrategias de micoparasitismo en esta cepa se identificaron la adhesión a *Botrytis* spp. y vacuolización citoplasmática.

Figura 30

Ensayo antagónico, Th14 contra Botrytis spp.



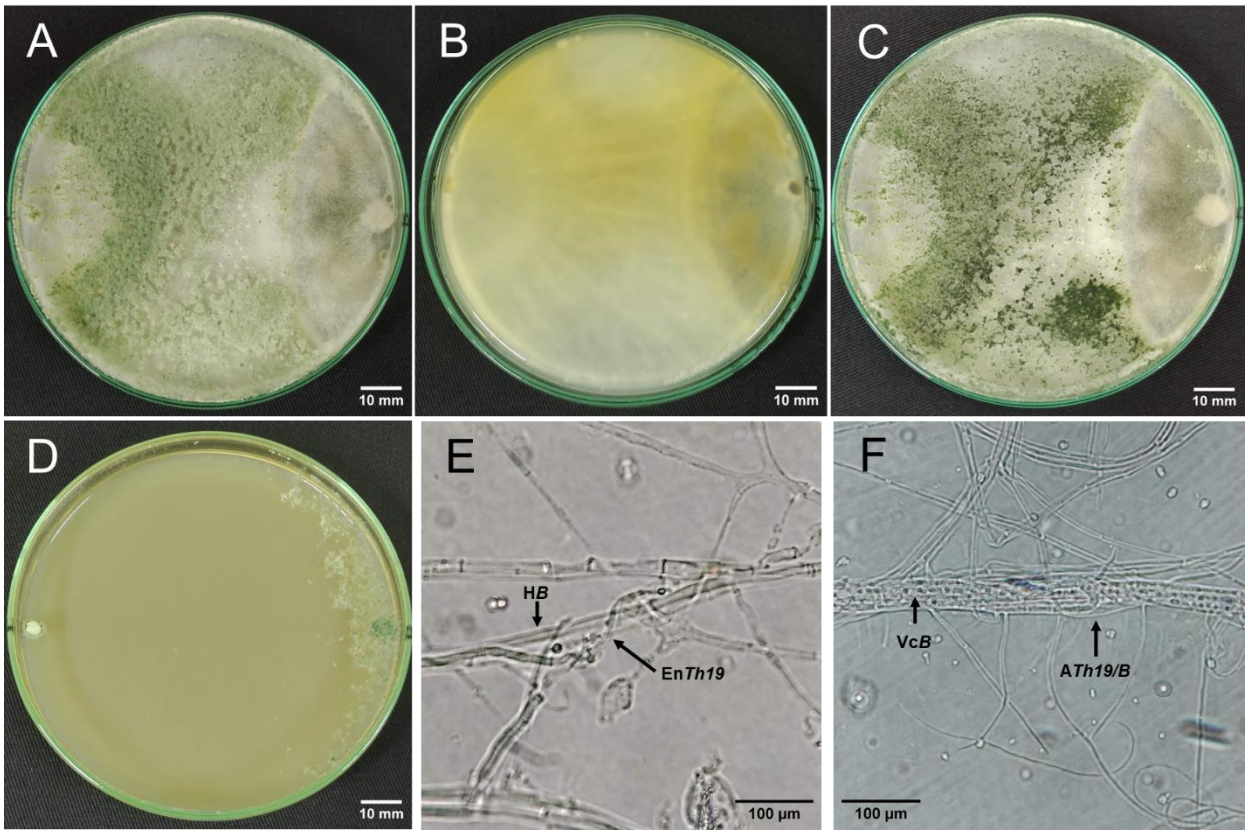
Nota. Cultivo dual *Th14* (izquierda)-*Botrytis* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 10 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 10 días; C. Enfrentamiento PDA, 15 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. vacuolización citoplasmática del HFP (Vc*B*); F. Adhesión de hifas del antagonista sobre la del HFP (A*Th14/B*) y vacuolización del citoplasma del fitopatógeno (Vc*B*). H*B*: Hifa *Botrytis* spp.; H*Th14:* Hifa *Th14;* Cl*Th14*: Clamidospora *Th14.* Fuente: Autor.

Th19 detuvo el crecimiento radial de *Botrytis* spp. al completar el quinto día, generando una leve liberación de pigmento en PDA, sin embargo, a diferencia de las demás cepas, no continuó su crecimiento sobre *Botrytis* spp., pero se observó la presencia de escasas pústulas cerca al inoculo del fitopatógeno en el décimo día (Figura 31-C). Por otra parte, en el AES el desarrollo de micelio translucido por *Th19* transcurrió con normalidad hasta el séptimo día, a partir de este momento se dio inicio al surgimiento de pústulas de conidiación sobre el inoculo y crecimiento radial inicial

del fitopatógeno. A nivel microscópico la interacción se da mediante la adhesión, enrollamiento y vacuolización de las hifas del HFP ensayado.

Figura 31

Ensayo antagónico, Th19 contra Botrytis spp.



Nota. Cultivo dual *Th19* (izquierda)-*Botrytis* spp. (derecha): A. Enfrentamiento PDA (anverso), 7 días; B. Enfrentamiento PDA (reverso), 7 días; C. Enfrentamiento PDA, 10 días; D. Enfrentamiento AES, 10 días; Estrategias de micoparasitismo: E. Enrollamiento del antagonista sobre el fitopatógeno (En*Th19*); F. Adhesión del antagonista sobre el HFP (A*Th19/B*) y vacuolización citoplasmática (Vc*B*). H*B*: Hifa *Botrytis* spp. Fuente: Autor.

Además de la invasión del antagonista sobre Botrytis y las estrategias de micoparasitismo desarrolladas, se consideró como mecanismo indirecto de acción la competencia por nutrientes, estableciendo una diferenciación entre las velocidades de crecimiento de *Trichoderma* spp. y el patógeno vegetal. De manera que, la Tabla 6 contiene las velocidades de crecimiento en PDA de

los organismos, donde, como primera impresión destaca la VCR del patógeno dado que su valor no presenta una diferencia estadísticamente significativa al establecido para *Th19* (Apéndice Tabla I1), por lo que esta similitud indica que el CR de estos bajo ciertos parámetros podría igualarse, anulando posiblemente la competencia por nutrientes.

Tabla 6

Relación VCR estimadas con Botrytis spp.

Cepa	Velocidad de crecimiento radial (mm/h)
Botrytis spp.	0,51
Th2	0,75
Th4	0,70
Th5	0,76
Th12	0,78
Th14	0,72
Th19	0,60

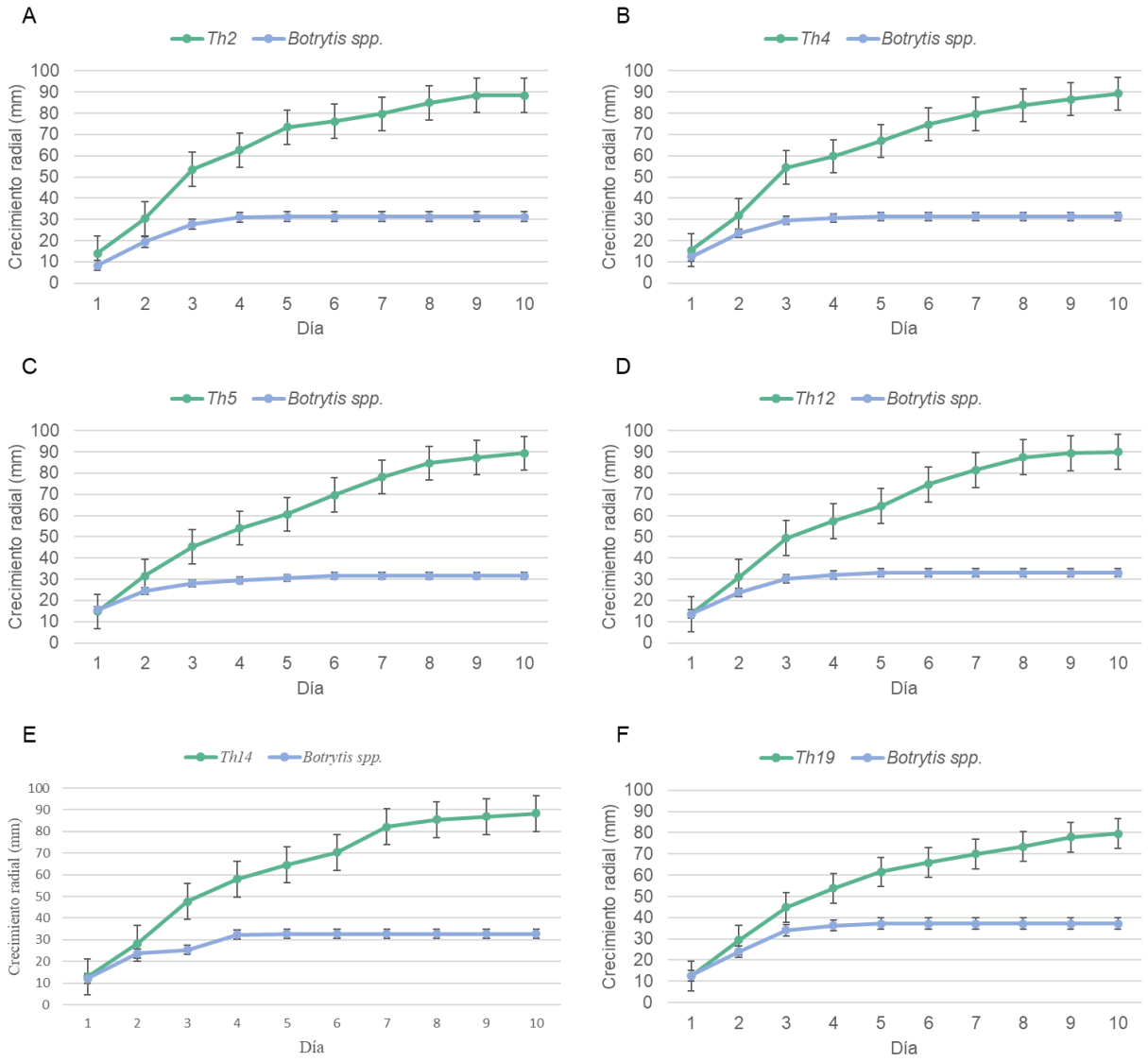
Nota. VCR descritas por las cepas en PDA, no existe una diferencia significativa entre las casillas sombreadas (LSD, $p<0,05$). Fuente: Autor.

Por otro lado, en la Figura 32 se presenta de forma gráfica el seguimiento del crecimiento radial descrito en los cultivos duales, dentro de los que destaca el avance radial de *Th2* sobre el del fitopatógeno superándolo en cerca de 8 mm durante los primeros dos días. La conducta del CR para *Th4*, *Th5* y *Th12* fue similar, mientras que en el caso de *Th14* y *Th19* el CR del patógeno vegetal fue similar al de las cepas, encontrando una mayor diferenciación hacia el tercer y cuarto día respectivamente. Aunque *Th19* no cubrió totalmente el micelio del fitopatógeno como las demás cepas, visualmente es notoria la diferencia entre su crecimiento radial y el de *Botrytis* spp.

pese a que permitió un mayor avance de este durante los enfrentamientos, motivo por el que a nivel *in-vitro* se infiere la manifestación de la competencia por nutrientes.

Figura 32

Crecimiento radial diario en cultivos duales con Botrytis spp.



Nota. Mediciones medias del CR, 10 días para los cultivos duales con *Botrytis* spp. en PDA: A. *Th2*; B. *Th4*; C. *Th5*; D. *Th12*; E. *Th14*; F. *Th19*. Fuente: Autor.

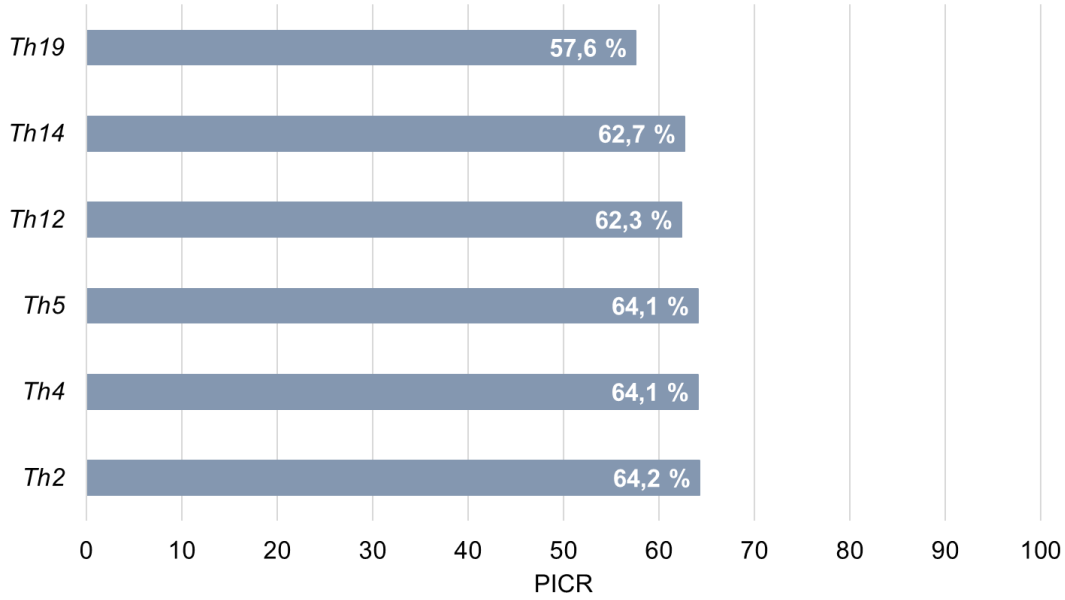
Las observaciones del comportamiento de *Trichoderma* spp. frente a *Botrytis* spp. están relacionas con las estrategias de micoparasitismo mencionadas en la sección de *Fusarium* spp.; sin embargo, un rasgo diferencial con este patógeno es que en las microcopias no se estableció la presencia de esporas que pertenecieran a *Botrytis* spp.; de acuerdo con la revisión de Dutta *et al.* (2023), la síntesis de proteasas desempeña un factor crucial en el control de este patógeno, debido a que en muchos análisis el control por competencia por recursos nutricionales no es suficiente, de esta forma, las proteasas han sido implicadas en la obstaculización del desarrollo de procesos patogénicos, al grado de reducir la germinación de los conidios y la biomasa de los tubos germinales, además de inactivar las enzimas del patógeno que agreden el tejido vegetal.

T. longibrachiatum se ha considerado como una especie potente en el control de *B. cinerea* mediante el establecimiento de relaciones simbióticas con las raíces de las plantas, evidenciado incrementos en las cantidades de flavonoides y lignina (Prashanth *et al.*, 2023). También se han establecido que *T. viride* y *T. atroviride* actúan como promotores de crecimiento e inductores de resistencia sistémica frente a este fitopatógeno (Andrade *et al.*, 2023).

Estimación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) de *Botrytis* spp. Frente a este fitopatógeno se registraron porcentajes máximos de inhibición con las cepas *Th4*, *Th5* y *Th2*, cuyos porcentajes pueden considerase homólogos valorados en promedio en 64,1 %. Nuevamente las cepas lograron contrarrestar más del 50 % del crecimiento radial del patógeno, sin embargo, el menor valor registrado fue el de *Th19* (57,6 %), que de acuerdo al análisis estadístico (Apéndice Tabla I3), exhibe diferencias significativas con los PICR de las cepas de mayor inhibición.

Figura 33

PICR de Botrytis spp. *conseguido por las cepas de Trichoderma* spp.



Nota. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *Botrytis* spp. (PICR) alcanzados por las cepas de *Trichoderma* spp. para el día 10 (LSD, p>0,05). Fuente: Autor.

Frecuentemente se considera que los porcentajes de inhibición pueden variar considerablemente de acuerdo a las especies del antagonista que se evalúen; de esta forma, para *T. harzianum* se informaron valores bajos de inhibición del 36 % por Palacios *et al.* (2020), pero también se indican valores promedio del 72,5 % para la misma especie (Calle & Fernanda, 2019). Por su parte, los aislados nativos de *Trichoderma* spp. evaluados por Villalpando *et al.* (2016), inhibieron el crecimiento radial de *B. cinerea* en un rango del 36% - 46 %; y en el caso de *T. asperellum* se ha logrado reducir el crecimiento radial de este HFP en un 75,6 % (Pincay *et al.*, 2021). Estas referencias establecen que la capacidad de *Trichoderma* spp. como ACB frente a *Botrytis* spp. es heterogénea y podría implicar otros factores de los cuales dependería la alta o baja inhibición del crecimiento radial.

Determinación del grado de invasión

Considerando todos los aspectos anteriormente mencionados, se estableció el grado de capacidad antagónica y poder biocontrolador para cada una de las cepas evaluadas de *Trichoderma* spp. frente a los dos patógenos propuestos; la información se recopila en Tabla 7, incluyendo además otros indicadores que tendrían una influencia directa en el comportamiento de las cepas como agentes de biocontrol.

Tabla 7

Potencial antagónico de las cepas evaluadas frente a los fitopatógenos.

Cepa	Indicador							
	Grado de antagonismo		Poder biocontrolador		Competencia por sustrato		Micoparasitismo	
	F	*B*	*F*	*B*	*F*	*B*	*F*	*B*
Th2	4		Muy bueno		+	+	+	
Th4					+	+		
Th5					+	+		
Th12					+	+		
Th14					+	+		
Th19					+	-		

Nota. La columna *F* indica los valores asignados al comportamiento de las cepas frente a *Fusarium* spp. mientras que la *B* contiene el registro de valores contra *Botrytis* spp.*;* el grado de antagonismo y poder biocontrolador fue establecido conforme a lo planteado por Ezziyyani *et al*. (2004) y Astorga *et al.* (2014). Fuente: Autor.

En todas las cepas evaluadas se estableció la capacidad antagónica como grado 4, debido a que esporularon sobre cada uno de los fitopatógenos, señalando para la totalidad de aislados un poder biocontrolador “muy bueno”, lo anterior conforme a la categorización propuesta por Ezziyyani *et al*. (2004), a la que años más tarde Astorga *et al.* (2014) incorporaron un calificativo para el poder biocontrolador de acuerdo al grado de antagonismo. A nivel nacional, se ha indicado que cepas de *T. harzianum* ostentan este mismo grado de antagonismo en ensayos con *Fusarium* spp. (Suárez Meza *et al.*, 2008). En relación a *Botrytis* spp., aislados de *Trichoderma* spp. se han

desarrollado en al menos 2/3 de la superficie del medio o directamente colonizaron la colonia de este HFP, aislados a los que se les asigno el grado I y II en la escala de Bell en estudios realizados por Calle y Fernanda (2019) y Villalpando *et al.* (2016) que podrían relacionarse con el grado 3 o 4 de la categorización de Ezziyyani *et al.* (2004) y Astorga *et al.* (2014).

Con efectos de comparar la capacidad antagónica de una cepa comercial y una nativa, Pérez (2021) informó el grado 2 tanto para la cepa comercial como para su aislado codificado como TN4 en ensayos *in-vitro* frente a *Fusarium* spp. en Pamplona, Norte de Santander; quien, además determinó que el aislado presentaba mejor capacidad antagónica en los ensayos en campo en relación al comercial, al inhibir totalmente la fitopatología causada por el patógeno vegetal en cultivos de lechuga. Por su parte, Ramos (2021) demostró que una cepa nativa presenta mejores rendimientos en el control de un fitopatógeno que un aislado oriundo y una cepa comercial; en este caso, el autor evaluó el potencial biocontrolador de un aislado procedente de Bucarasica (N. de S.) y un aislado nativo de Pamplona (N. de S.), para las que se registraron los grados 0 y 4 respectivamente, el rendimiento de este último fue notorio al relacionar la capacidad antagónica del aislado nativo y una cepa comercial, donde, pese a que en ambos casos el grado fue de 4, el aislado nativo permitió la inhibición de *Botrytis* spp. para el día 4, mientras la cepa comercial lo logró al sexto día. Lo anterior permite inferir que la adaptación a las condiciones ambientales de la región puede potenciar el efecto antagónico de cepas nativas, con las cuales el biocontrol sea más efectivo en comparación con biopreparados comerciales.

Estas favorables valoraciones son producto del sinergismo que puede existir con los demás indicadores. De ellos, el micoparasitismo es uno de los mejores procesos para reprimir el avance de los fitopatógenos, en donde, además de la competencia por nutrientes está estrechamente relacionada la producción de algunos otros metabolitos con acción antifúngica. Comúnmente

Trichoderma spp. de define como un parasito microtrofo-necrótrofo, que toma nutrientes de hongos a los que les induce la muerte, sin embargo, también se ha descrito la conducta de hemibiotrofos, en la que el daño estructural hacia el patógeno se da de manera paulatina y el antagonista puede vivir intracelularmente por un periodo de tiempo (Mukherjee *et al.,* 2022).

De manera paralela, la competencia por nutrientes potencializa la eficacia del género *Trichoderma* para controlar diversos patógenos, debido a que este indicador puede colonizar rápidamente la raíz de las plantas, obstaculizando la invasión de patógenos al captar apresuradamente todos los nutrientes y oxigeno que requieren los fitopatógenos para su desarrollo (Prashanth *et al.*, 2023; Yao *et al.*, 2023).

Conclusiones

Las características morfológicas de las cepas evaluadas permitieron realizar una identificación presuntiva a nivel de especie, sin embargo, pueden no representar con certeza la identidad que se registraría con una caracterización molecular. Pese a lo anterior, las cepas pertenecen posiblemente a *T. longibrachiatum, T. harzianum, T. koningii, T. atroviride, T. citrinoviride* y *T. reesei.*

La ecofisiología de las cepas de *Trichoderma* spp. fue diversa, no obstante, permitió indicar la capacidad de las cepas para adaptarse a condiciones que pueden ser adversas para el desarrollo de otros organismos, propiedad que se considera necesaria en un agente de control biológico.

La actividad enzimática propia de los organismos agrícolas evidenció aptitudes favorables dentro del potencial biocontrolador del género, que propician el desarrollo de estrategias de micoparasitismo y la potencial promoción del crecimiento vegetal.

Las cepas nativas evaluadas exhiben bajo condiciones *in-vitro* un potencial biocontrolador semejante frente a *Fusarium* spp. y *Botrytis* spp., mediante factores dentro de los que puede haber sinergismo como el micoparasitismo, la competencia por nutrientes y la agresividad para inhibir el desarrollo de los fitopatógenos. Así mismo, las estrategias de micoparasitismo desarrolladas pueden estar validadas por la caracterización enzimática cualitativa registrada.

Recomendaciones

Los factores ambientales pueden causar variaciones en el comportamiento de *Trichoderma* spp., limitando su efectividad como biocontrolador, por lo que debe considerarse realizar los ensayos bajo condiciones que asemejen la dinámica agrícola de la región, sugiriendo de esta forma la realización de ensayos en campo. Se aconseja la identificación genotípica de las cepas con mejor desempeño en el control de los fitopatógenos, así como la caracterización de indicadores vinculados a la antibiosis y cuantificar la actividad enzimática, de tal forma que eventualmente sea posible realizar el escalado para el desarrollo de posibles bioinsumos.

Referencias

Abdulaal, W. H. (2018). Purification and characterization of α-amylase from Trichoderma pseudokoningii. *BMC Biochemistry*, *19*(1), 4. https://doi.org/10.1186/s12858-018-0094-8

Acero, S. R. (2010). *Conservamos -Guía Técnica de Preservación en Bibliotecas*. *5*(5), 51.

Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Huang, Z., Chen, H. Y. H., & Lu, G. (2019). Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with Trichoderma in focus. *Microbial Pathogenesis*, *129*, 7-18. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.042

Amaro, T. M. M. M., Cope, J., & Franco-Orozco, B. (2021). Current status of plant pathogens of agricultural importance for Colombia. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, *15*(2), Article 2. https://doi.org/10.17584/rcch.2021v15i2.12425

Amid, A., Sulaiman, S., Jimat, D. N., & Azmin, N. F. M. (Eds.). (2018). *Multifaceted Protocol in Biotechnology*. Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2257-0

Andrade, P., Rivera, M. N., Landero, N., Silva, H. V., Martínez, S. J., & Romero, O. (2023). Beneficios ecológicos y biológicos del hongo cosmopolita Trichoderma spp. en la agricultura: Una perspectiva en el campo mexicano. *Revista Argentina de Microbiología*, *55*(4), 366-377. https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.06.005

Antúnez, O. M., Sandoval, M., Alcántar, G., & Solís, M. (2014). Aplicación de amonio y nitrato en plantas de Physalis peruviana L. *Agrociencia*, *48*(8), 805-817.

Anual y Mensual del Tiempo—Pamplona, Colombia. (s. f.). Weather Atlas. Recuperado 1 de febrero de 2024, de https://www.weather-atlas.com/es/colombia/pamplona-clima

Asad, S. A. (2022). Mechanisms of action and biocontrol potential of Trichoderma against fungal plant diseases—A review. *Ecological Complexity*, *49*, 100978. https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2021.100978

Astorga, K., Meneses, K., Zuñiga, C., Brenes, J., & Rivera. (2014). *Evaluación del antagonismo de Trichoderma s p. Y Bacillus subtilis contra tres patógenos del ajo*. *27*(2), 82-91.

Atanasova, L., Crom, S. L., Gruber, S., Coulpier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of Trichodermamycoparasitism. *BMC Genomics*, *14*(1), 121. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-121

Baazeem, A., Almanea, A., Manikandan, P., Alorabi, M., Vijayaraghavan, P., & Abdel-Hadi, A. (2021). In Vitro Antibacterial, Antifungal, Nematocidal and Growth Promoting Activities of Trichoderma hamatum FB10 and Its Secondary Metabolites. *Journal of Fungi*, *7*(5), Article 5. https://doi.org/10.3390/jof7050331

Biswas, P., Bharti, A., Kadam, A., & Dutt, D. (2019). Wheat Bran as Substrate for Enzyme Production and its Application in the Bio-deinking of Mixed Office Waste (MOW) Paper. *Bioresources*, *14*, 5788-5806. https://doi.org/10.15376/biores.14.3.5788-5806

Borchers, A., Teuber, S. S., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2010). Food Safety. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *39*(2), 95-141. https://doi.org/10.1007/s12016-009-8176-4

Bozdeveci, A., & Karaoğlu, Ş. A. (2023). Determination of Biocontrol Properties of Two Local Trichoderma Isolates. *Biology Bulletin*, *50*(6), 1172-1181. https://doi.org/10.1134/S1062359023602057

Calle, M., & Fernanda, P. (2019). *Control biológico del moho gris (Botrytis cinerea) en cultivos de fresa (Fragaria vesca L.) mediante hongos filamentosos antagonistas*.

Carro Huerga, G., Mayo Prieto, S., Rodríguez-González, Á., Álvarez-García, S., Gutiérrez, S., & Casquero, P. A. (2021). The Influence of Temperature on the Growth, Sporulation, Colonization, and Survival of Trichoderma spp. In Grapevine Pruning Wounds. *Agronomy*, *11*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/agronomy11091771

Castellanos, L., Torrado, J., & Céspedes, N. (2021). *Alternativas biológicas para el control de Fusarium oxysporum en arveja en pamplona, Norte de Santander | Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/index

Castillo Guerra, D. A., Viteri Flórez, P. A., & Viteri Rosero, S. E. (2015). DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN INÓCULO DE HONGOS CELULOLÍTICOS. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 18(1), 217-226.

Chávez, M., Montaña-Lara, J. S., Martínez-Salgado, M. M., Mercado-Reyes, M., Rodríguez, M. X., & Quevedo-Hidalgo, B. (2008). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de Trichoderma sp. *Universitas Scientiarum*, *13*.

Chen, K., & Zhuang, W.-Y. (2017). Discovery from a large-scaled survey of Trichoderma in soil of China. Scientific Reports, 7(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07807-3

Chihat, S., Aleandri, M. P., Vannini, A., Bruni, N., & Boureghda, H. (2021). Identity and biocontrol efficiency of Trichoderma spp. Isolated from different soils and ecosystems in Algeria. *Journal of Plant Pathology*, *103*(2), 493-511. https://doi.org/10.1007/s42161-021-00761-0

Chinheya, C. C., Mlambo, L. C., Shamudzarira, G., Jere, J., Karavina, C., Mahere, T., Marunda, M., Zvobgo, G., & Dimbi, S. (2023). Evaluation of the potentials of Bacillus and Trichoderma isolates as biocontrol agents against Meloidogyne javanica and Phytophthora

infestans and plant growth promoters in potatoes (Solanum tuberosum). *European Journal of Plant Pathology*, *167*(4), 699-714. https://doi.org/10.1007/s10658-023-02756-2

Daryaei, A., Jones, E. E., Glare, T. R., & Falloon, R. E. (2016). pH and water activity in culture media affect biological control activity of Trichoderma atroviride against Rhizoctonia solani. *Biological Control*, *92*, 24-30. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.001

De Azevedo, A., De Marco, J., & Felix, C. (2000). Characterization of an amylase produced by a Trichoderma harzianum isolate with antagonistic activity against Crinipellis perniciosa, the causal agent of witches' broom of cocoa. *FEMS Microbiology Letters*, *188*(2), 171-175. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09189.x

Decreto 1376 de 2013 (2013). https://www.minambiente.gov.co/documento-entidad/decreto-1376-de-2013/

Decreto 2811 de 1974 (1974). https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=1551

Deng, J.-J., Huang, W.-Q., Li, Z.-W., Lu, D.-L., Zhang, Y., & Luo, X. (2018). Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from Trichoderma harzianum against pathogenic fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, *112*, 35-42. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.02.002

Dini, I., Alborino, V., Lanzuise, S., Lombardi, N., Marra, R., Balestrieri, A., Ritieni, A., Woo, S. L., & Vinale, F. (2022). Trichoderma Enzymes for Degradation of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. *Molecules*, *27*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/molecules27123959

Dutta, P., Deb, L., & Pandey, A. K. (2022). Trichoderma- from lab bench to field application: Looking back over 50 years. *Frontiers in Agronomy*, *4*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fagro.2022.932839

Dutta, P., Mahanta, M., Singh, S. B., Thakuria, D., Deb, L., Kumari, A., Upamanya, G. K., Boruah, S., Dey, U., Mishra, A. K., Vanlaltani, L., VijayReddy, D., Heisnam, P., & Pandey, A. K. (2023). Molecular interaction between plants and Trichoderma species against soil-borne plant pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *14*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1145715

Eida, M. F., Nagaoka, T., Wasaki, J., & Kouno, K. (2011). Evaluation of cellulolytic and hemicellulolytic abilities of fungi isolated from coffee residue and sawdust composts. *Microbes and Environments*, *26*(3), 220-227. https://doi.org/10.1264/jsme2.me10210

Ellison, P. J., Harrower, K. M., Chilvers, G. A., & Owens, J. D. (1981). Patterns of sporulation in Trichoderma viride. *Transactions of the British Mycological Society*, *76*(3), 441-445. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(81)80071-X

Expósito, L., Bott, A., Drullet, M., & del Valle, E. (2010). *EVALUACION DE AGAR UREA DE CHRISTENSEN MODIFICADO*. *68*(4). https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=551757301004

Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., & Candela, M. E. (2004). Biocontrol por Streptomyces rochei –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (Capsicum annuum L.) causada por Phytophthora capsici. *Anales de Biología*.

Fan, H., Yao, M., Wang, H., Zhao, D., Zhu, X., Wang, Y., Liu, X., Duan, Y., & Chen, L. (2020). Isolation and effect of Trichoderma citrinoviride Snef1910 for the biological control of root-knot nematode, Meloidogyne incognita. *BMC Microbiology*, *20*(1), 299. https://doi.org/10.1186/s12866-020-01984-4

Fath, B. (2019). *Encyclopedia of Ecology*. http://p5070-www.sciencedirect.com/referencework/9780444641304/encyclopedia-of-ecology

Gams, W., & Bissett, J. (1998). *Morphology and identification of Trichoderma. InTrichoderma and Gliocladium.* https://scholar.google.com/scholar_lookup?&title=Morphology%20and%20identification%20of%20Trichoderma&pages=3-34&publication_year=1998&author=Gams%2CW&author=Bissett%2CJ

Gams, W., & Bissett, J., D. (2002). *Trichoderma and Gliocladium* (C. Kubicek & G. Harman, Eds.; Vol. 1). Taylor & Francis.

Gao, M.-J., Yan, J.-J., Zhao, Y., Zhu, L., Yang, G.-S., & Zhan, X.-B. (2021). Expression of a thermostable β-1,3-glucanase from Trichoderma harzianum in Pichia pastoris and use in oligoglucosides hydrolysis. *Process Biochemistry*, *107*, 74-82. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.010

Gao, W., Fan, C., Zhang, W., Li, N., Liu, H., & Chen, M. (2023). Heterotrophic nitrification of organic nitrogen in soils: Process, regulation, and ecological significance. *Biology and Fertility of Soils*, *59*(3), 261-274. https://doi.org/10.1007/s00374-023-01707-7

Gezgin, Y., Gül, D. M., Şenşatar, S. S., Kara, C. U., Sargın, S., Sukan, F. V., & Eltem, R. (2020). Evaluation ofTrichoderma atroviride and Trichoderma citrinoviride growth profiles and their potentials as biocontrol agent and biofertilizer. *Turkish Journal of Biochemistry*, *45*(2), 163-175. https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0378

Gutiérrez, I., Moreno, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: Casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, *32*(1), 1-12. https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009

Herrán, J., & García, C. (2015). *Técnicas de caracterización de suelos y abonos orgánicos*.

Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, *87*(1), 4-10. https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4

Howell, C. R., Stipanovic, & Robert D. (1983). Gliovirin, a new antibiotic from Gliocladium virens, and its role in the biological control of Pythium ultimum. *Canadian Journal of Microbiology*, *29*(3), 321-324. https://doi.org/10.1139/m83-053

Hua, Z., Min, Q., Yifan, L., Xing, D., Ke-Qin, Z., & Zefen, Y. (2021). *New Species of Trichoderma Isolated as Endophytes and Saprobes from Southwest China*. *7*(6), 467. https://doi.org/10.3390/jof7060467

Huang, X. G., Li, M. Y., Yan, X. N., Yang, J. S., Rao, M. C., & Yuan, X. F. (2021). The potential of Trichoderma brevicompactum for controlling root rot on Atractylodes macrocephala. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *43*(6), 794-802. https://doi.org/10.1080/07060661.2021.1933602

Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). MECANISMOS DE ACCIÓN DE Trichoderma FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Revista de Protección Vegetal*, *24*(1), 14-21.

Khurana, N., Saxena, R. K., Gupta, R., & Kuhad, R. C. (1993). Light-independent conidiation in Trichoderma spp.: A novel approach to microcycle conidiation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *9*(3), 353-356. https://doi.org/10.1007/BF00383079

Korkom, Y., & Yildiz, A. (2022). Evaluation of biocontrol potential of native Trichoderma isolates against charcoal rot of strawberry. *Journal of Plant Pathology*, *104*(2), 671-682. https://doi.org/10.1007/s42161-022-01063-9

Leal, Y. D., Martínez, D. I., & Coca, B. M. (2021). Biocontrol de cepas de Trichoderma spp. Frente a aislados de Fusarium spp. Procedentes de frijol (Phaseolus vulgaris L.). 36(2).

Li, Y., Wei, H., Liu, M., Yang, J., & Han, X. (2023). Nine years of low-dose biochar amendment suppresses nitrification rate in low-yield brown soil. *Applied Soil Ecology*, *192*, 105096. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.105096

Liu, B., Ji, S., Zhang, H., Wang, Y., & Liu, Z. (2020). Isolation of Trichoderma in the rhizosphere soil of Syringa oblata from Harbin and their biocontrol and growth promotion function. Microbiological Research, 235, 126445. https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126445

López, G. L. (2021). Análisis molecular de hongos antagonistas aislados de plantaciones de cacao (Theobroma cacao) de Norte de Santander. *Ingeniería y Competitividad*, *23*(2), e21511154. https://doi.org/10.25100/iyc.v23i2.11154

Mahmood, S., & Rahman, S. (2008). Production and Partial Characterization of Extracellular α-Amylase by Trichoderma viride. *Bangladesh Journal of Microbiology*, *25*. https://doi.org/10.3329/bjm.v25i2.4870

Manoharachary, C., Singh, H. B., & Varma, A. (Eds.). (2020). *Trichoderma: Agricultural Applications and Beyond* (Vol. 61). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54758-5

Merjan, A. (2017). *The Fusarium Laboratory Manual*.

MinAgricultura. (2016). *El 83.5% de los alimentos que consumen los colombianos son producidos por nuestros campesinos*. MinAgricultura. https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/El-83-de-los-alimentos-que-consumen-los-colombianos-son-producidos-por-nuestros-campesinos.aspx

Montes, D. E., Barboza, A., & Pérez, A. (2022). Antifungal and growth activity of strains of Trichoderma spp. Against the Avocado "tristeza" disease, Phytophthora cinnamomi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *32*(1), 115. https://doi.org/10.1186/s41938-022-00613-8

Moreno, M., Delgado, J., Codón, A. C., & Benítez, T. (2007). pH and Pac1 control development and antifungal activity in Trichoderma harzianum. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, *44*(12), 1355-1367. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.07.012

Moreno, N. C. R., & Lozano, C. A. T. (2006). *ESTANDARIZACIÓN DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE CaCO3, SO4(NH4)2 Y KNO3 PARA LA PRUEBA DEL NMP CON BACTERIAS NITRIFICANTES Y DENITRIFICANTES USANDO COMO MATRIZ COMPOST*.

Morlá, A., Mas-Diego, S., Cabeza Pullés, D., & Campos, M. (2010). Influencia de la luz solar en el crecimiento y esporulación del biofungicida Trichoderma viride. *Revista Tecnología Química*, *20*.

Mukherjee, P. K., Mendoza, A., Zeilinger, S., & Horwitz. (2022). Mycoparasitism as a mechanism of Trichoderma-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews*, *39*, 15-33. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.11.004

Nawaz, K., Anwar, W., Subhani, M. N., Akhter, A., Iftikhar, S., Khan, H. A. A., & Shahid, A. A. (2023). Glucanase Gene of Trichoderma; New Strategy for the Management of Root Rot Disease in Chili. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. https://doi.org/10.1007/s42729-023-01543-6

Nawrocka, J., & Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by Trichoderma. *Biological Control*, *67*(2), 149-156. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.07.005

Nofal, R., Mohamed, R., T, A., & Mahnoud, M. (2021). *Mycoparasitic nature of Egyptian Trichoderma isolates and their impact on suppression Fusarium wilt of tomato | Egyptian Journal of Biological Pest Control | Full Text*. *103*. https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-021-00450-1

ONU. (s. f.). *Hambre y seguridad alimentaria—Desarrollo Sostenible*. Recuperado 9 de febrero de 2024, de https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/hunger/

Palacios, O., Vásquez, É., Rodrígues, A., Espinoza, F., Vidal, R., & Cruz, M. (2020). *Evaluación in vitro de métodos contra Botrytis cinerea*. *11*(3). https://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v11n3/2007-0934-remexca-11-03-593.pdf

Pamplona, D. (s. f.). *DANE Nacional de Estadistica*.

Pandey, A. K., Samota, M. K., Tanti, A. J., & Babu, A. (2023). Trichoderma reesei induces defense-related biochemical markers associated with resistance to Fusarium dieback in tea crop. *Biological Control*, *180*, 105200. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105200

Park, M. S., Seo, G. S., Lee, K. H., Bae, K. S., & Yu, S. H. (2005). Morphological and Cultural Characteristics of Trichoderma spp. Associated with Green Mold of Oyster Mushroom in Korea. *The Plant Pathology Journal*, *21*(3), 221-228. https://www.ppjonline.org/journal/view.php?doi=10.5423/PPJ.2005.21.3.221

Pérez, M. K. F. (2021). *EFECTO COMPARATIVO DE UNA LOCAL NATIVA Y OTRA COMERCIAL DE Trichoderma spp.. PARA EL CONTROL DE Fusarium spp.. PRESENTE*

EN UN CULTIVO DE LECHUGA (Lactuca sativa L..) PAMPLONA – NORTE DE SANTANDER.

Persoon. (1801). *Trichoderma Persoon ex Gray, 1801*. https://www.gbif.org/es/species/7703803

Persoon, C. H. (1794). *CH: Disposita methodical fungorum—Google Académico*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?author=C.%20H.+Persoon&publication_year=1794&title=Dispositamethodicafungorum&journal=Romer%E2%80%99s+Neues+Mag.+Bot.&volume=1&pages=81

Pincay, A., Noboa, M., Viera, W., Herrera, K., León, A., & Jackson, T. (2021). *Evaluación in vitro del potencial antagonista de Trichoderma sp. Y hongos endófitos de mora (Rubus glaucus Benth) para el control de Botrytis cinerea*. https://doi.org/10.5281/zenodo.4917695

Pitson, S. M., Seviour, R. J., & McDougall, B. M. (1993). Noncellulolytic fungal β-glucanases: Their physiology and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, *15*(3), 178-192. https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90136-P

Política Nacional para la Gestión integral de la Biodiversidad y sus Servicios Ecosistémicos, 128 (2012). https://www.minambiente.gov.co/direccion-de-bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistemicos/politica-nacional-para-la-gestion-integral-de-la-biodiversidad-y-sus-servicios-ecosistemicos/

Prameeladevi, T., Prabhakaran, N., Kamil, D., Toppo, R. S., & Tyagi, A. (2018). Trichoderma pseudokoningii identified based on morphology was re-identified as T. longibrachiatum through molecular characterization. *Indian Phytopathology*, *71*(4), 579-587. https://doi.org/10.1007/s42360-018-0067-2

Prashanth, K., Sathish, G., Srinivas, J., & Chandrasekhar, B. (2023). Trichoderma Species and Their Biological Mechanisms. *International Journal of Environment and Climate Change*, *13*(10), 1637-1651. https://doi.org/10.9734/ijecc/2023/v13i102819

Ramos, C. S. (2021). *Efecto protector de una cepa nativa y de una comercial de Trichoderma spp en el cultivo de Fresa (fragaria x ananassa). Caso aplicado en la vereda Monteadentro del municipio de Pamplona, Norte de Santander.* http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/handle/20.500.12744/2939

Redmond, M. J., & Fielder, D. A. (2013). Procedimiento de extracción y de purificación mejorado para beta (1-3) beta (1-4) glucano de cereal (Patent ES2413007T3). https://patents.google.com/patent/ES2413007T3/es

Resolución 375 de 2004, 00375 78 (2004). https://www.ica.gov.co/normatividad/normas-ica/resoluciones-oficinas-nacionales/resoluciones-derogadas/resolucion-375-de-2004.aspx

Resolución 698 de 2011 Instituto Colombiano Agropecuario - ICA (2011). https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=41620

Resolución 068370 de 2020 (2020). https://www.ica.gov.co/getattachment/14d518e8-7f1d-4867-819c-b0ec3828f847/2020R68370.aspx

Rezusta, A., Sánchez, A., & Gil, J. (2007). *Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico*. 22.

Rodríguez, D., & Wang, A. (2020). Efectividad a nivel in vitro de Trichoderma spp. Nativos e importados contra Fusarium oxysporum*. *Agronomía Costarricense*, *44*(2), 109-125. https://www.redalyc.org/journal/436/43666322006/html/

Rodríguez, M. del V., Campo, R., Cardona, C., Manjarres, E., & Rossi, B. (2021). Trichoderma spp. Biocontrolador de marchitez vascular (Fusarium spp.) de la berenjena en el Caribe colombiano. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, *19*(2 (Julio-Diciembre)), 158-169.

Rokaya, N., Paneru, A., Timila, R. D., Dhita, S. P., Shrestha, R. K., KC, G. B., & Manandhar, H. K. (2023). *Evaluation of native isolates of Trichoderma spp. For controlling potato late blight caused by Phytophthora infestans in Nepal*. *1*(9), 9.

Romero, O. (2012). Effect of pH on growth of the mycelium of Trichoderma viride and Pleurotus ostreatus in solid cultiv\ation mediums. *AFRICAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEEARCH*, *7*(34). https://doi.org/10.5897/AJAR12.568

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A., & Petrini, O. (2002). Trichoderma species associated with the green mold epidemic of commercially grown Agaricus bisporus. *Mycologia*, *94*(1), 146-170. https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833257

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B.-S., Petrini, O., Schroers, H.-J., & Druzhinina, I. S. (2006). The Trichoderma koningii aggregate species. *Studies in Mycology*, *56*, 67-133. https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03

Samuels, G. J., Ismaiel, A., Mulaw, T. B., Szakacs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., & Jaklitsch, W. M. (2012). The Longibrachiatum Clade of Trichoderma: A revision with new species. *Fungal Diversity*, *55*(1), 77-108. https://doi.org/10.1007/s13225-012-0152-2

Sarria, G., Garcia, A., Mestizo, Y., Medina, C., Varón, F., MESA, E., & Hernández, S. (2021). ANTAGONISTIC INTERACTIONS BETWEEN Trichoderma spp. AND Phytophthora palmivora (Butler) FROM OIL PALM IN COLOMBIA. *European Journal of Plant Pathology*, *161*(4), 751-768. https://doi.org/10.1007/s10658-021-02363-z

Shahid, M., Singh, A., Srivastava, M., Mishra, R., & Biswas, S. (2011). *Effect of temperatura, pH and media for growth and sporulation of Trichoderma longibrachiatum and self life study in carrier based formulations*. *19*(1), 147-149. https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:apps&volume=19&issue=1&article=034

Sharma, A. K., & Sharma, P. (Eds.). (2020). *Trichoderma: Host Pathogen Interactions and Applications*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1

Sharma, S., Kour, D., Rana, K. L., Dhiman, A., Thakur, S., Thakur, P., Thakur, S., Thakur, N., Sudheer, S., Yadav, N., Yadav, A. N., Rastegari, A. A., & Singh, K. (2019). Trichoderma: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. En A. N. Yadav, S. Mishra, S. Singh, & A. Gupta (Eds.), *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives* (pp. 85-120). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_3

Siddiquee, S. (2017). Morphology-Based Characterization of Trichoderma Species. En S. Siddiquee (Ed.), *Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of Trichoderma Species from Tropical Regions* (pp. 41-73). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7_4

Silva, L. a. O., Terrasan, C. R. F., & Carmona, E. C. (2015). Purification and characterization of xylanases from Trichoderma inhamatum. *Electronic Journal of Biotechnology*, *18*(4), 307-313. https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.06.001

Simmons, E. G. (1977). *«Classification of some cellulase-producing Trichoderma species» in International mycolohical congress, 2nd. Eds. Bigelow H. E., Simmons E. G. (Tampa: University of South Florida), 618.*

https://scholar.google.com/scholar_lookup?author=E.%20G.+Simmons&publication_year=1977&title=Classification%20of%20some%20cellulase-producing%20trichoderma%20species&book=International+mycolohical+congress&pages=618

Smith, A., Beltrán, C. A., Kusunoki, M., Cotes, A. M., Motohashi, K., Kondo, T., & Deguchi, M. (2013). Diversity of soil-dwelling Trichoderma in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary. *Journal of General Plant Pathology*, *79*(1), 74-85. https://doi.org/10.1007/s10327-012-0419-1

Stange, P., Seidl, S., Karl, T., & Benz, J. P. (2023). Evaluation of Trichoderma isolates as biocontrol measure against Claviceps purpurea. *European Journal of Plant Pathology*, *167*(4), 651-675. https://doi.org/10.1007/s10658-023-02716-w

Suárez, C. L., Fernández, R. J., Valero, N. O., Gámez, R. M., & Páez, A. R. (2008). Antagonismo in vitro de Trichoderma harzianum Rifai sobre Fusarium solani (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *10*(2), 35-43.

Suárez, L., & Cabrales, C. P. (2008). *Identificación de especies de cepas nativas de Trichoderma sp. Y Bacillus sp. Y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo Moniliophthora roreri en el departamento de Norte de Santander* (1). https://revistas.ufps.edu.co/index.php/respuestas/article/view/553

Suesca, A. (2012). *PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS A PARTIR DE CULTIVOS DE Trichoderma sp. CON BIOMASA LIGNOCELULÓSICA* [Universidad Nacional de Colombia]. https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/10652/300054.2012.pdf?sequence=1

Sui, L., Li, J., Philp, J., Yang, K., Wei, Y., Li, H., Li, J., Li, L., Ryder, M., Toh, R., Zhou, Y., Denton, M. D., Hu, J., & Wang, Y. (2022). Trichoderma atroviride seed dressing influenced the fungal community and pathogenic fungi in the wheat rhizosphere. *Scientific Reports*, *12*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-022-13669-1

Tang, G.-T., Li, Y., Zhou, Y., Zhu, Y.-H., Zheng, X.-J., Chang, X.-L., Zhang, S.-R., & Gong, G.-S. (2022). Diversity of Trichoderma species associated with soil in the Zoige alpine wetland of Southwest China. *Scientific Reports*, *12*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-022-25223-0

Thakur, A. K., & Norris, R. V. (1928). A BIO-CHEMICAL STUDY OF SOME SOIL FUNGI WITH SPECIAL REFERENCE TO AMMONIA PRODUCTION. *Journal of the Indian Institute of Science*, *11*(0), Article 0.

Torres, M., Ortiz García, C. F., Bautista-Muñoz, C., Ramírez-Pool, J. A., Ávalos-Contreras, N., Cappello-García, S., & De la Cruz-Pérez, A. (2015). Diversidad de Trichoderma en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *86*(4), 947-961. https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.07.012

Tulasne, L.-R., & Tulasne, C. (1865). *Tulasne, L.-R.; Tulasne, C. 1865: Selecta Fungorum Carpologia. 3. The Imperial Press. - Biota of NZ*. https://biotanz.landcareresearch.co.nz/references/1cb0fd83-36b9-11d5-9548-00d0592d548c

Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ściseł, J. (2022). Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/ijms23042329

Villamizar, L. F., Barrera, G., Hurst, M., & Glare, T. R. (2021). Characterization of a new strain of Metarhizium novozealandicum with potential to be developed as a biopesticide. Mycology, 12(4), 261-278. https://doi.org/10.1080/21501203.2021.1935359

Villalpando, C., Murillo, B., Zapata, S., Guerrero, E., & Mónaco, C. (2016). *COMPARACIÓN IN VITRO DE CEPAS NATIVAS DE Trichoderma sp. COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE Botrytis cinerea*. *20*, 29-36.

Waghunde, R. R., Shelake, R. M., & Sabalpara, A. N. (2016). Trichoderma: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research*, *11*(22), 1952-1965. https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10584

Wang, Y., Zeng, L., Wu, J., Jiang, H., & Mei, L. (2022). Diversity and effects of competitive Trichoderma species in Ganoderma lucidum–cultivated soils. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1067822

Wu, H., Chen, S., Ding, J., Tian, W., Wang, T., Shen, L., Li, Y., Liu, Z., & Li, J. (2022). New finding of Trichoderma asperellum in decreasing soil N2O emission. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *9*(1), 77. https://doi.org/10.1186/s40538-022-00338-8

Xiao, Z., Zhao, Q., Li, W., Gao, L., & Liu, G. (2023). Strain improvement of Trichoderma harzianum for enhanced biocontrol capacity: Strategies and prospects. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1146210

Yan, Y., Mao, Q., Wang, Y., Zhao, J., Fu, Y., Yang, Z., Peng, X., Zhang, M., Bai, B., Liu, A., Chen, S., & Ahammed, G. J. (2021). Trichoderma harzianum induces resistance to root-knot nematodes by increasing secondary metabolite synthesis and defense-related enzyme

activity in Solanum lycopersicum L. *Biological Control*, *158*, 104609. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104609

Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1160551

Yogalakshmi, S., Thiruvudainambi, S., Kalpana, K., Vendan, R. T., & Oviya, R. (2021). Antifungal activity of Trichoderma atroviride against Fusarium oxysporum.f.sp.lycopersici causing wilt disease of tomato. *Journal of Horticultural Sciences*, *16*(2), 241-250.

Apéndices

Apéndice A

Composición medios de cultivo

Tabla A

Composición de los medios de cultivo propuestos.

Medio	Composición	Cantidad	Fuente
PDA	Almidón de patata (infusión) Dextrosa Agar	4 g 20 g 15 g	Composición según BD-Difco
CMD	Harina de maíz Dextrosa Agar	40 g 20 g 15 g	(Rui et al., 2023)
SNA	Fosfato monopotásico Nitrato de potasio Sulfato de magnesio Cloruro de potasio Glucosa Sacarosa Agar Agua destilada	1 g 1 g 0,5 g 0,5 g 0,2 g 0,2 g 20 g 1000 mL	(Romero, 2011)
Agar avena	Avena Agar	60 g 12,5 g	Composición según BD-Difco
Basal modificado quitina	Sulfato de magnesio Sulfato de amonio Fosfato monopotásico Ácido cítrico monohidratado Agar Quitina coloidal Purpura de bromocresol Agua destilada	0,3 g 3 g 2 g 1 g 30 g 4,5 g 0,15 g 1000 mL	(Hernández Melchor et al., 2023)
Agar salvado de trigo	Salvado de trigo Sulfato de zinc Sulfato de cobre (II) Agar Agua destilada	30 g 0,01 g 0,005 g 15 g 1000 mL	(Eida et al., 2011)
Agar precipitado β-glucanos	Precipitado β-glucanos Sulfato de zinc Sulfato de cobre (II) Agar Agua destilada	30 g 0,01 g 0,005 g 15 g 1000 mL	Adaptado de Eida et al. (2011)
CMC	Carboximetilcelulosa Extracto de levadura Peptona universal Sulfato de amonio Cloruro de calcio Fosfato monobásico de potasio Fosfato dibásico de potasio Agar Agua destilada	10 g 2,5 g 2,5 g 0,5 g 0,5 g 0,2 g 0,2 g 15 g 1000 mL	(Rodríguez & Vives, 2012)
Skim milk	Leche desnatada Agar nutritivo Agua destilada	10% (p/v) 25 g 1000 mL	(Amid et al., 2018)
Agar almidón	Almidón hidrosoluble Cloranfenicol Extracto de levadura Agar	10 g 50 mg 3 g 12 g	(Acero, 2010)
Agar urea	Peptona Glucosa Cloruro de sodio Fosfato disódico Dihidrógenofosfato de potasio Rojo de fenol Agar	1 g 1 g 5 g 1,2 g 0,8 g 0,012 g 15 g	Composición según OXOID
Agar amonio	Sulfato de amonio Carbonato de calcio Fosfato de potasio Sulfato de magnesio Cloruro de sodio Sulfato ferroso Agar Agua destilada	0,5 g 1 g 1 g 0,3 g 0,3 g 0,03 g 18 g 950 mL	(Moreno & Lozano, 2006)
Agar extracto de suelo	Agar Glucosa Fosfato dibásico de potasio Extracto de suelo Agua destilada	15 g 1 g 0,5 g 100 mL 1000 mL	(Herrán & García, 2015)

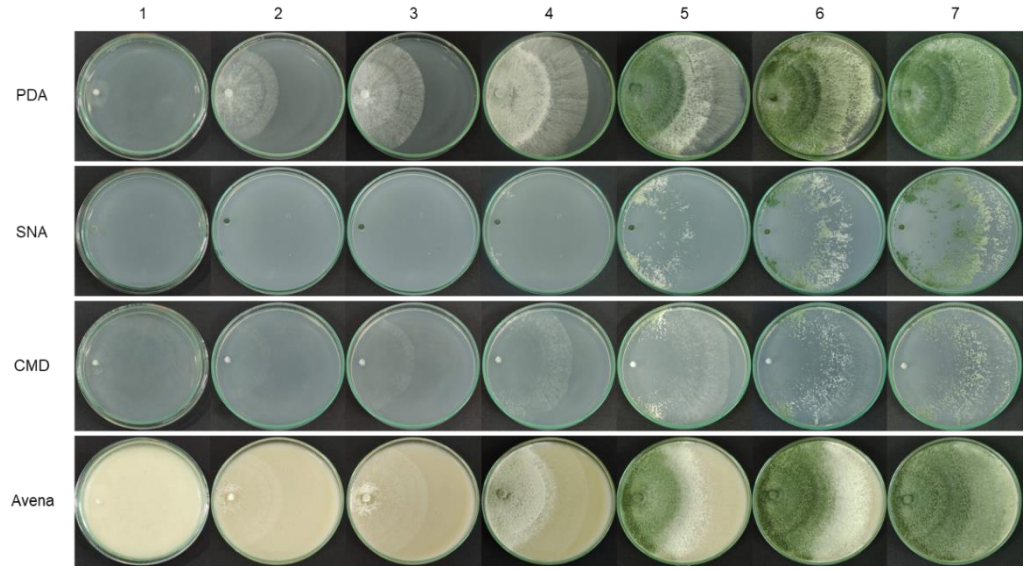
Fuente: Elaboración propia.

Apéndice B

Seguimiento caracterización fenotípica

Figura B1

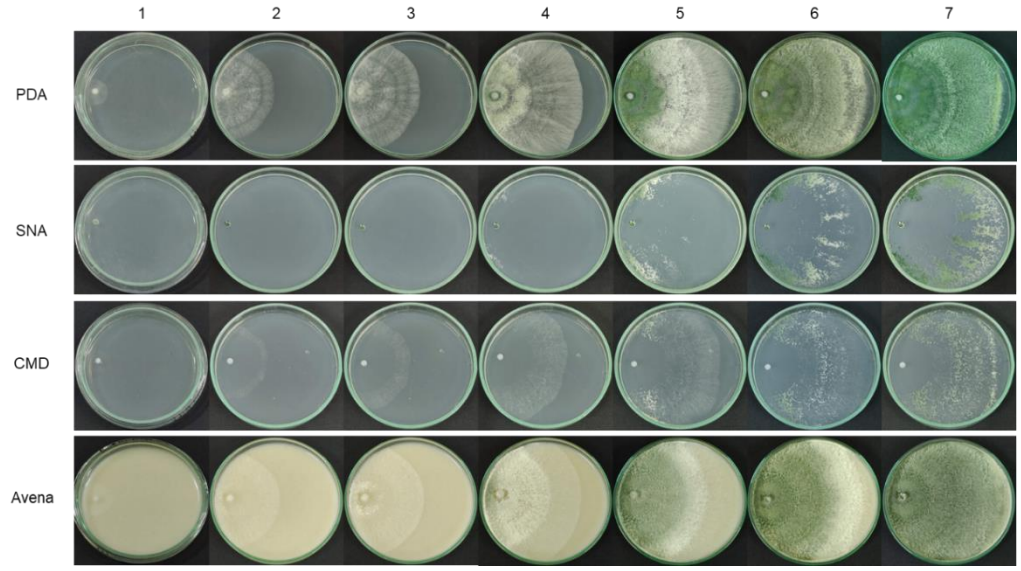
Seguimiento del desarrollo descrito por Th2 en diferentes medios, 7 días.



Fuente: Autor.

Figura B2

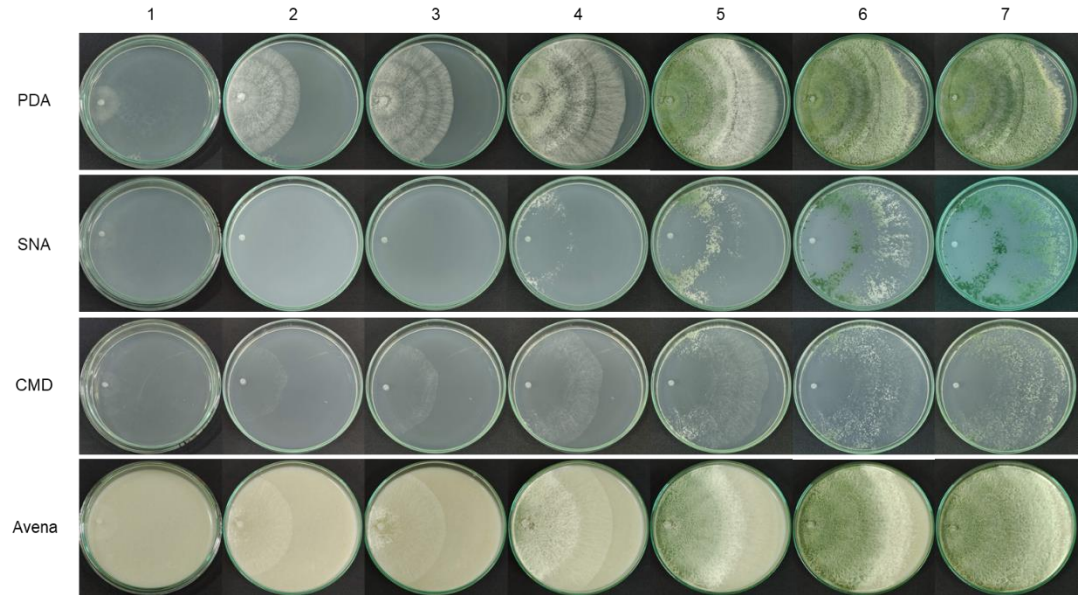
Seguimiento del desarrollo descrito por Th4 en diferentes medios, 7 días.



Fuente: Autor.

Figura B3

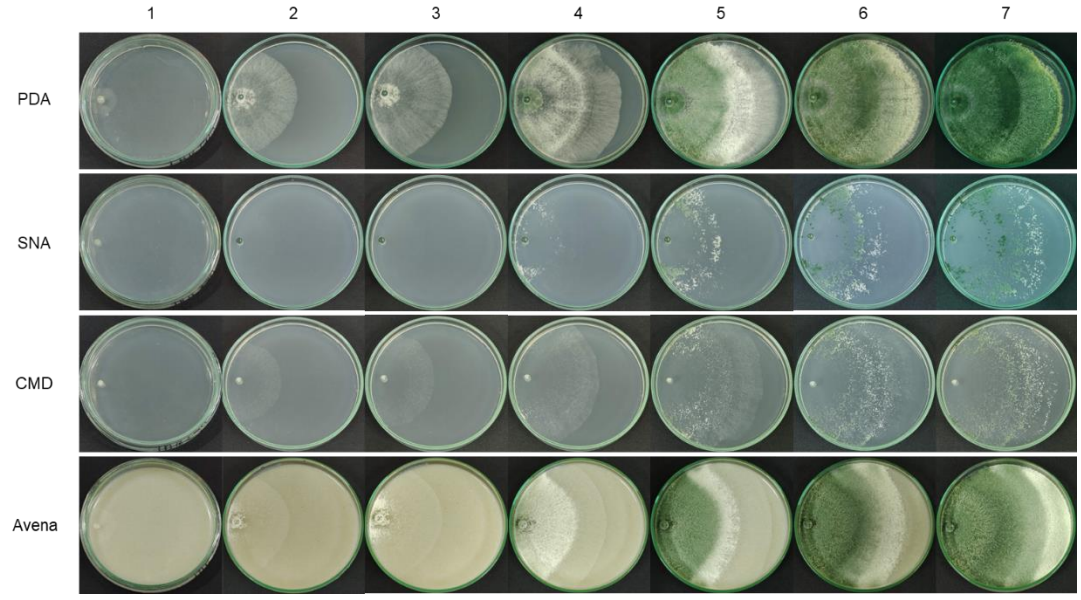
Seguimiento del desarrollo descrito por Th5 en diferentes medios, 7 días.



Fuente: Autor.

Figura B4

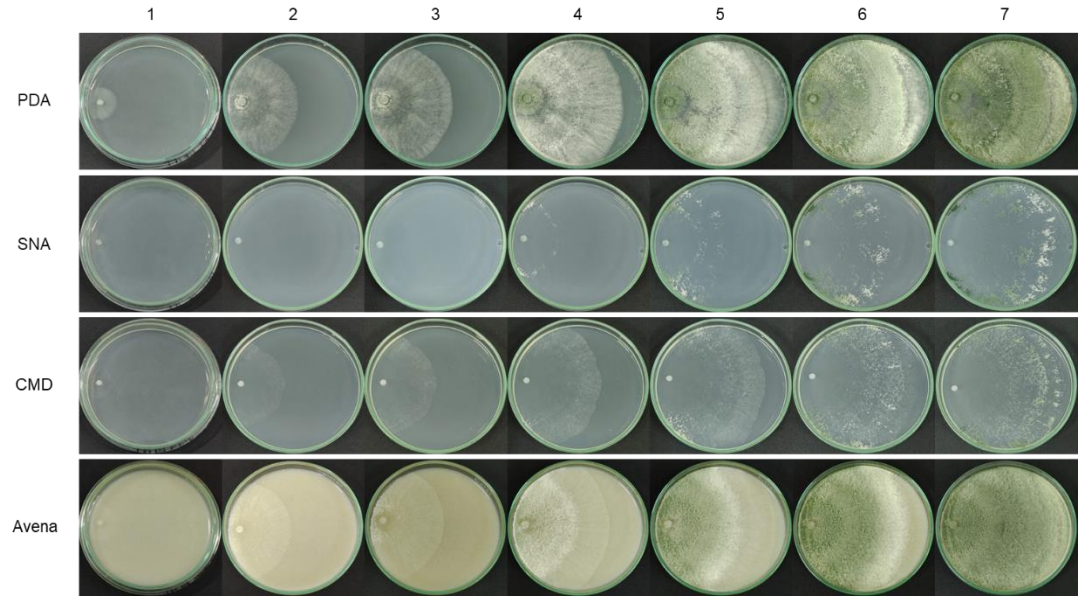
Seguimiento del desarrollo descrito por Th12 en diferentes medios, 7 días.



Fuente: Autor.

Figura B5

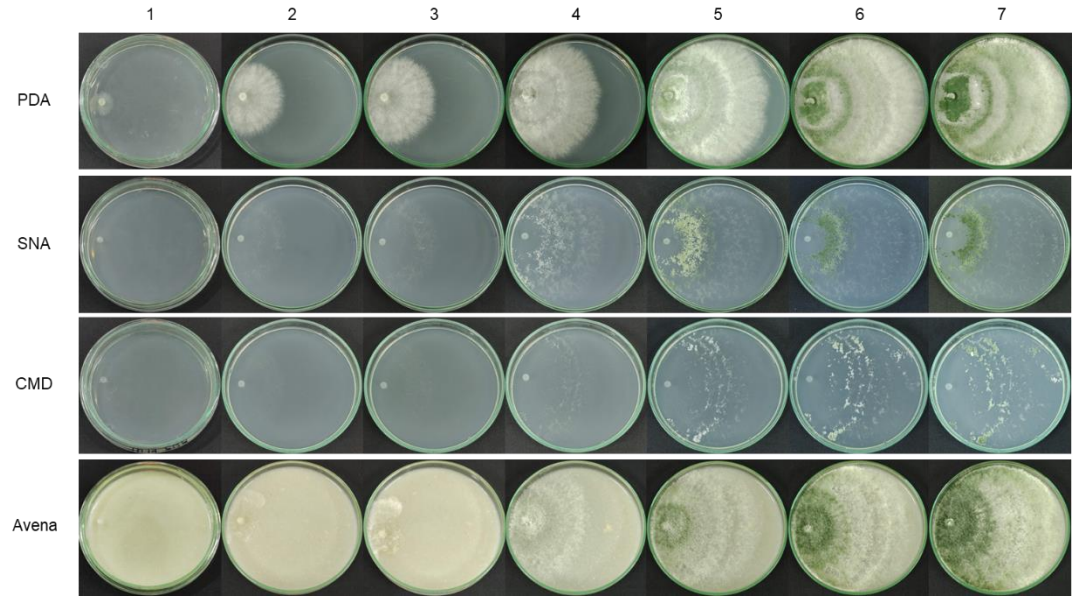
Seguimiento del desarrollo descrito por Th14 en diferentes medios, 7 días.



Fuente: Autor.

Figura B6

Seguimiento del desarrollo descrito por Th19 en diferentes medios, 7 días.



Fuente: Autor.

Apéndice C

Caracterización macroscópica y microscópica

Tabla C1

Características a nivel macroscópico y microscópico en los medios ensayados, Th2.

Nivel	Morfología		Medio de Cultivo			
			PDA	SNA	CMD	AVENA
Macroscópico	Micelio		Buen crecimiento, poco micelio aéreo	Micelio sumergido traslúcido, sin micelio aéreo, mayor inducción de esporulación	Micelio traslúcido sumergido, sin micelio aéreo	Buen crecimiento, abundante micelio aéreo
	Colonia	Forma	Radial, con anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos
		Color	Blanco, tornándose verde al esporular	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Blanco que se torna verde al esporular
		Borde	Regular	Filamentoso	Filamentoso	Regular
		Brillo	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
		Textura	Algodonosa, granulosa	Granular	Granular	Algodonosa, granulosa
Microscópico	Hifas		Septadas	Septadas	Septadas	Septadas
	Conidióforo		Simple	Simple	Simple	Simple
	Fiálides	Forma	Casi cilíndrica	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme
		Tamaño	8,9 x 15,6 µm	No se diferencian claramente	7,5 x 18,5 µm	7,7 x 16 µm
	Conidios	Forma	Circular	Circular	Circular	Circular
		Tamaño	4,2 x 4,7 µm	6,5 x 6,1 µm	5,6 x 5,1 µm	6,9 x 6,8 µm
		Pared	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
		Color	Verde	Verde	Verde	Verde
	Clamidosporas		Subglobosa terminal			

Fuente: Autor.

Tabla C2

Características a nivel macroscópico y microscópico en los medios ensayados, Th4.

Nivel	Morfología		Medio de Cultivo			
			PDA	SNA	CMD	AVENA
Macroscópico	Micelio		Buen crecimiento, poco micelio aéreo	Micelio sumergido traslúcido, sin micelio aéreo, mayor inducción de esporulación	Micelio traslúcido sumergido, sin micelio aéreo	Buen crecimiento, abundante micelio aéreo
	Colonia	Forma	Radial, con anillos concéntricos	Radial, sin anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos
		Color	Blanco, tornándose verde amarillento al esporular	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Blanco que se torna verde al esporular
		Borde	Regular	Filamentoso	Filamentoso	Regular
		Brillo	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
		Textura	Algodonosa, granulosa	Granular	Granular	Algodonosa, granulosa
Microscópico	Hifas		Septadas	Septadas	Septadas	Septadas
	Conidióforo		Ramificado	Ramificado	Ramificado	Ramificado
	Fiálides	Forma	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme
		Tamaño	6,2 x 12,5 µm	8,4 x 16 µm	6,7 x 14,6 µm	9 x 15,1 µm
	Conidios	Forma	Circular a subgloboso	Circular a subgloboso	Circular a subgloboso	Circular
		Tamaño	4,1 x 3,9 µm	6,9 x 7,2 µm	7,1 x 6,8 µm	5,7 x 5,1µm
		Pared	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
		Color	Verde	Verde	Verde	Verde
	Clamidosporas		Subglobosa terminal			

Fuente: Autor.

Tabla C3

Características a nivel macroscópico y microscópico en los medios ensayados, Th5.

Nivel	Morfología		Medio de Cultivo			
			PDA	SNA	CMD	AVENA
Macroscópico	Micelio		Buen crecimiento, poco micelio aéreo	Micelio sumergido traslúcido, sin micelio aéreo, mayor inducción de esporulación	Micelio traslúcido sumergido, sin micelio aéreo	Buen crecimiento, abundante micelio aéreo
	Colonia	Forma	Radial, con anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos de pústulas	Radial, con anillos concéntricos de pústulas	Radial, con anillos concéntricos
		Color	Blanco que se torna verde al esporular	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Blanco que se torna verde al esporular
		Borde	Regular	Filamentoso	Filamentoso	Regular
		Brillo	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
		Textura	Algodonosa, granulosa	Granular	Granular	Algodonosa, granulosa
Microscópico	Hifas		Septadas	Septadas	Septadas	Septadas
	Conidióforo		Simple	Ramificado	Ramificado	Ramificado
	Fiálides	Forma	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme
		Tamaño	6,6 x 16,1 µm	7,6 x 13,1 µm	7,2 x 14,5 µm	6 x 12 µm
	Conidios	Forma	Circular	Circular a subgloboso	Circular a subgloboso	Circular
		Tamaño	2,7 x 3,0 µm	5,1 x 5,2 µm	6,8 x 6,3 µm	4 x 4,3 µm
		Pared	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
		Color	Verde	Verde	Verde	Verde
	Clamidosporas		Subglobosa terminal			

Fuente: Autor.

Tabla C4

Características a nivel macroscópico y microscópico en los medios ensayados, Th12.

Nivel	Morfología		Medio de Cultivo			
			PDA	SNA	CMD	AVENA
Macroscópico	Micelio		Buen crecimiento, poco micelio aéreo	Micelio sumergido traslúcido, mayor inducción de esporulación	Micelio traslúcido sumergido, sin micelio aéreo	Buen crecimiento, abundante micelio aéreo
	Colonia	Forma	Radial, con leves anillos concéntricos	Radial, sin anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos
		Color	Blanco que se torna verde-amarillo al esporular	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Blanco que se torna verde al esporular
		Borde	Regular	Filamentoso	Filamentoso	Regular
		Brillo	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
		Textura	Algodonosa, granulosa	Granular	Granular	Algodonosa, granulosa
Microscópico	Hifas		Septadas	Septadas	Septadas	Septadas
	Conidióforo		Ramificado	Ramificado	Ramificado	Ramificado
	Fiálides	Forma	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme
		Tamaño	8,3 x 19,6 µm	8,7 x 15,3 µm	6 x 11,5 µm	6,2 x 12,9 µm
	Conidios	Forma	Circular	Circular a subgloboso	Circular a subgloboso	Circular a subgloboso
		Tamaño	2,8 x 2,8 µm	5,9 x 6,3 µm	5 x 5,3 µm	5,6 x 5,7 µm
		Pared	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
		Color	Verde	Verde	Verde	Verde
	Clamidosporas		Subglobosa terminal			

Fuente: Autor.

Tabla C5

Características a nivel macroscópico y microscópico en los medios ensayados, Th14.

Nivel	Morfología		Medio de Cultivo			
			PDA	SNA	CMD	AVENA
Macroscópico	Micelio		Buen crecimiento, poco micelio aéreo	Micelio sumergido traslúcido, mayor inducción de esporulación	Micelio traslúcido sumergido, sin micelio aéreo	Buen crecimiento, abundante micelio aéreo
	Colonia	Forma	Radial, con leves anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos	Radial, con leves anillos concéntricos
		Color	Blanco que se torna verde al esporular	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Blanco que se torna verde al esporular
		Borde	Regular	Filamentoso	Filamentoso	Regular
		Brillo	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
		Textura	Algodonosa, granulosa	Granular	Granular	Algodonosa, granulosa
Microscópico	Hifas		Septadas	Septadas	Septadas	Septadas
	Conidióforo		Ramificado	Ramificado	Ramificado	Ramificado
	Fiálides	Forma	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme
		Tamaño	8 x 16,1 µm	7,8 x x16 µm	7,6 x 15,4 µm	7,9 x 15,8 µm
	Conidios	Forma	Circular	Circular a subgloboso	Circular a subgloboso	Circular
		Tamaño	3,2 x 3,4 µm	5,7 x 6,5 µm	5,3 x 5,7 µm	5,5 x 5,5 µm
		Pared	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
		Color	Verde	Verde	Verde	Verde
	Clamidosporas		Subglobosa terminal			

Fuente: Autor.

Tabla C6

Características a nivel macroscópico y microscópico en los medios ensayados, Th19.

Nivel	Morfología		Medio de Cultivo			
			PDA	SNA	CMD	AVENA
Macroscópico	Micelio		Buen crecimiento, denso, abundante micelio aéreo y menor esporulación	Micelio sumergido traslúcido, sin micelio aéreo, mayor inducción de esporulación	Micelio traslúcido sumergido, sin micelio aéreo	Buen crecimiento, abundante micelio aéreo y menor esporulación
	Colonia	Forma	Radial, con anillos concéntricos bien definidos	Radial, con anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos	Radial, con anillos concéntricos
		Color	Blanco que se torna verde al esporular	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación densamente agrupadas	Traslúcido, con formación de pústulas de conidiación	Blanco que se torna verde al esporular
		Borde	Regular	Filamentoso	Filamentoso	Regular
		Brillo	Opaco	Opaco	Opaco	Opaco
		Textura	Algodonosa, granulosa	Granular	Granular	Algodonosa, granulosa
Microscópico	Hifas		Septadas	Septadas	Septadas	Septadas
	Conidióforo		Ramificado	Ramificado	Ramificado	Ramificado
	Fiálides	Forma	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme	Lageniforme
		Tamaño	7,2 x 15,4 µm	6,1 x 14 µm	8,2 x 13,4 µm	6,8 x 17,9 µm
	Conidios	Forma	Circular	Circular a subgloboso	Circular a subgloboso	Circular
		Tamaño	3,4 x 3,5 µm	3,7 x 4,2 µm	3,8 x 4,4 µm	4,4 x 5 µm
		Pared	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
		Color	Verdes	Verdes	Verdes	Verdes
	Clamidosporas		Subglobosa terminal			

Fuente: Autor.

Apéndice D

Identificación preliminar a nivel de especie

Tabla D1

Identificación presuntiva según clave taxonómica de Gams & Bissett (2002).

Aislado	Clave taxonómica para *Trichoderma*
Th2	1(b) Conidios derramados o fasciculados a pustulados, los conidios a menudo son verdes; conidióforos con frecuentes ramas laterales; fiálides en su mayoría lageniformes a ampuliformes. 2(a) Ejes principales del conidióforo largos con ramas secundarias cortas, que no se ramifican extensamente; ramas y fiálides que frecuentemente surgen solas, particularmente las terminales; conidios lisos, pero a veces con ornamentación llamativa, sinuosa, en forma de alas o ampollada. **Clave de especies sección *Longibrachiatum*** 1(b) Conidios generalmente de paredes lisas o algunos conidios con extensiones pustuladas de la capa exterior de la pared. 2(b) Conidióforos muy escasamente ramificados; fiálides casi cilíndricas y apenas o nada constreñido en la base; los conidios en su mayoría son mayores que 4,0 × 2,5 µm. 4(b) Conidios generalmente de menos de 5,0 µm. 6(a) Conidios de cilíndricos cortos a ovoides, con una base cónicamente ahusada, 4,0–5,5 × 2,0–2,5 µm; reverso sin colorear. . . . . ***T. longibrachiatum***
Th4	1(b) Conidios derramados o fasciculados a pustulados, los conidios a menudo son verdes; conidióforos con frecuentes ramas laterales; fiálides en su mayoría lageniformes a ampuliformes. 2(b) Conidióforos ramificándose repetidamente; ramas y fiálides pareadas o verticiladas, también las que están en posición terminal; conidios de paredes lisas o verrugosos. 3(b) Conidióforos y ramas estrechas y flexibles (eje principal de hasta 6 µm de ancho); fiálides principalmente en verticilos de 2 o 3(–5), lageniformes a subulados; conidios siempre verdes. **Clave de especies sección *Trichoderma*** 1(b) Colonias de crecimiento más rápido. 3(b) Conidios subglobosas a elipsoidales cortas u ovadas. 4(b) Conidios subglobosas a elipsoidales cortas. 5(a) Conidios completamente maduras de color verde pálido, 2,5–3,5 × 2,1–3,0 µm. . . . . ***T. harzianum***
Th5	1(b) Conidios derramados o fasciculados a pustulados, los conidios a menudo son verdes; conidióforos con frecuentes ramas laterales; fiálides en su mayoría lageniformes a ampuliformes. 2(b) Conidióforos ramificándose repetidamente; ramas y fiálides pareadas o verticiladas, también las que están en posición terminal; conidios de paredes lisas o verrugosos. 3(b) Conidióforos y ramas estrechas y flexibles (eje principal de hasta 6 µm de ancho); fiálides principalmente en verticilos de 2 o 3(–5), lageniformes a subulados; conidios siempre verdes. **Clave de especies sección *Trichoderma*** 1(b) Colonias de crecimiento más rápido. 3 (a) Conidios cilíndricos, 3,0–4,8 × 1,9–2,8 µm. . . . . ***T. koningii***
Th12	1(b) Conidios derramados o fasciculados a pustulados, los conidios a menudo son verdes; conidióforos con frecuentes ramas laterales; fiálides en su mayoría lageniformes a ampuliformes. 2(b) Conidióforos ramificándose repetidamente; ramas y fiálides pareadas o verticiladas, también las que están en posición terminal; conidios de paredes lisas o verrugosos. 3(b) Conidióforos y ramas estrechas y flexibles (eje principal de hasta 6 µm de ancho); fiálides principalmente en verticilos de 2 o 3(–5), lageniformes a subulados; conidios siempre verdes. **Clave de especies sección *Trichoderma*** 1(b) Colonias de crecimiento más rápido. 4(b) Conidios subglobosas a elipsoidales cortas. 5(b) Los conidios completamente maduros se vuelven de color verde oscuro. 6(b) Conidios completamente maduros de paredes lisas, generalmente de 2,6 a 3,8 × 2,2 a 3,4 µm. . . . . ***T. atroviride***
Th14	1(b) Conidios derramados o fasciculados a pustulados, los conidios a menudo son verdes; conidióforos con frecuentes ramas laterales; fiálides en su mayoría lageniformes a ampuliformes. 2(a) Ejes principales del conidióforo largos con ramas secundarias cortas, que no se ramifican extensamente; ramas y fiálides que frecuentemente surgen solas, particularmente las terminales; conidios lisos, pero a veces con ornamentación llamativa, sinuosa, en forma de alas o ampollada. **Clave de especies sección *Longibrachiatum*** 1(b) Conidios generalmente de paredes lisas o algunos conidios con extensiones pustuladas de la capa exterior de la pared. 2(a) Conidióforos con ramas laterales que comúnmente se ramifican una o dos veces dos veces; fiálides claramente constreñidas en la base; conidios en su mayoría más pequeños que 4,0 × 2,5 µm. 3(a) Colonias con áreas conidiales que típicamente forman pústulas grandes y compactas; conidiación en tonos amarillo verdoso u oliva oscura en cultivos más antiguos; conidios elipsoidales y en su mayoría más pequeños que 3,5 × 2,0 µm. . . . . ***T. citrinoviride***
Th19	1(b) Conidios derramados o fasciculados a pustulados, los conidios a menudo son verdes; conidióforos con frecuentes ramas laterales; fiálides en su mayoría lageniformes a ampuliformes. 2(a) Ejes principales del conidióforo largos con ramas secundarias cortas, que no se ramifican extensamente; ramas y fiálides que frecuentemente surgen solas, particularmente las terminales; conidios lisos, pero a veces con ornamentación llamativa, sinuosa, en forma de alas o ampollada. **Clave de especies en sección *Longibrachiatum*** 1(b) Conidios generalmente de paredes lisas o algunos conidios con extensiones pustuladas de la capa exterior de la pared. 2(a) Conidióforos con ramas laterales que comúnmente se ramifican una o dos veces dos veces; fiálides claramente constreñidas en la base; conidios en su mayoría más pequeños que 4,0 × 2,5 µm. 2(b) Conidióforos muy escasamente ramificados; fiálides casi cilíndricas y apenas o nada constreñido en la base; los conidios en su mayoría son mayores que 4,0 × 2,5 µm. 4(b) Conidios generalmente de menos de 5,0 µm. 6 (b) Conidios ovoides a elipsoides, 3,5–4,5 × 2,3–3,0 µm; colonia exudando amarillo pigmento en el agar. . . . . ***T. reesei***

Fuente: Autor.

Apéndice E

Mediciones diarias del crecimiento radial

Tabla E1

Crecimiento radial descrito por las cepas agrícolas en los medios de caracterización fenotípica

Cepa	Medio	Día									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Th2	PDA	20	37	55	76	90	90	90	90	90	90
	SNA	18	27	41	58	75	90	90	90	90	90
	CMD	12	34	48	65	80	90	90	90	90	90
	Avena	25	40	56	74	90	90	90	90	90	90
Th4	PDA	19	37	52	74	84	90	90	90	90	90
	SNA	13	30	43	61	77	90	90	90	90	90
	CMD	19	34	44	60	75	90	90	90	90	90
	Avena	22	38	54	71	88	90	90	90	90	90
Th5	PDA	24	41	58	79	87	90	90	90	90	90
	SNA	20	34	50	67	82	90	90	90	90	90
	CMD	18	35	47	65	76	90	90	90	90	90
	Avena	22	37	51	70	86	90	90	90	90	90
Th12	PDA	19	40	56	76	82	87	90	90	90	90
	SNA	13	26	38	51	63	78	90	90	90	90
	CMD	17	33	45	61	74	87	90	90	90	90
	Avena	19	35	48	65	80	90	90	90	90	90
Th14	PDA	22	40	57	77	90	90	90	90	90	90
	SNA	16	27	38	54	66	83	90	90	90	90
	CMD	20	32	45	62	75	90	90	90	90	90
	Avena	21	36	50	68	83	90	90	90	90	90
Th19	PDA	19	35	50	66	80	90	90	90	90	90
	SNA	19	35	51	68	84	90	90	90	90	90
	CMD	20	35	47	60	76	90	90	90	90	90
	Avena	18	22	25	57	75	88	90	90	90	90

Nota. Las casillas sombreadas señalan el día en que la cepa completo su crecimiento radial (mm). Fuente: Autor.

Tabla E2

Prueba de Múltiple Rangos para las VCR; método; 95,0 porcentaje LSD

Cepa	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
Th12	4	0,625	0,0240298	A
Th19	4	0,625	0,0240298	A
Th14	4	0,63	0,0240298	A
Th5	4	0,6525	0,0240298	A
Th4	4	0,6575	0,0240298	A
Th2	4	0,6875	0,0240298	A

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
Th12 - Th14		-0,005	0,0724337
Th12 - Th19		0	0,0724337
Th12 - Th2		-0,0625	0,0724337
Th12 - Th4		-0,0325	0,0724337
Th12 - Th5		-0,0275	0,0724337
Th14 - Th19		0,005	0,0724337
Th14 - Th2		-0,0575	0,0724337
Th14 - Th4		-0,0275	0,0724337
Th14 - Th5		-0,0225	0,0724337
Th19 - Th2		-0,0625	0,0724337
Th19 - Th4		-0,0325	0,0724337
Th19 - Th5		-0,0275	0,0724337
Th2 - Th4		0,03	0,0724337
Th2 - Th5		0,035	0,0724337
Th4 - Th5		0,005	0,0724337

Nota. En la parte superior se presenta un grupo homogéneos, por lo que no existen diferencias significativas entre las VCR de las cepas. En el segundo apartado, se designa con un asterisco las parejas de cepas que presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95,0%. (p>0,05). Fuente: Autor.

Apéndice F

Crecimiento diametral de *Trichoderma* spp. en la escala de pH

Tabla F1

Seguimiento del crecimiento diametral dentro de la escala de pH.

Cepa	*pH*	Día						
		1	2	3	4	5	6	7
Th2	3	6,5	39,5	70,5	85,5	90	90	90
	5	7,25	49	80,25	90	90	90	90
	7	6,5	37,5	64,75	89,5	90	90	90
	9	5,75	29	51,5	89,25	90	90	90
Th4	3	0	25,75	45,25	71,25	90	90	90
	5	0	30,25	60	89	90	90	90
	7	0	27,25	46	87,75	90	90	90
	9	0	21	39,25	78,5	90	90	90
Th5	3	0	26,5	55	83,75	87,75	90	90
	5	0	26,75	57	90	90	90	90
	7	0	16	45,25	84,75	90	90	90
	9	0	16,75	27,5	62,75	86	90	90
Th12	3	8,75	38	55,5	90	90	90	90
	5	8,5	20,5	51,25	88,75	90	90	90
	7	0	16	42	82,25	90	90	90
	9	0	9	32,25	66,5	84,5	90	90
Th14	3	8,5	36,75	70,5	90	90	90	90
	5	0	14,5	46,25	87,5	90	90	90
	7	0	11	35,25	71,5	89,5	90	90
	9	0	12	27,75	58	79,5	90	90
Th19	3	5	28,25	70,75	90	90	90	90
	5	0	10,25	30,25	82,25	90	90	90
	7	0	5,75	11,25	44,5	79	90	90
	9	0	9,5	19,5	58,25	85,5	85,5	90

Nota. Medidas medias del crecimiento diametral de las cepas dentro de la escala de pH ensayada (mm), 7 días. Las casillas sombreadas señalan los valores de DC seleccionados para el análisis. Fuente: Autor.

Tabla F2

Prueba de Múltiple Rangos para el efecto del pH sobre los DC; método; 95,0 porcentaje LSD.

pH	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
9	6	68,8833	4,31221	A
7	6	76,7083	4,31221	AB
3	6	85,0833	4,31221	B
5	6	87,9167	4,31221	B

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
3 - 5		-2,83333	12,9984
3 - 7		8,375	12,9984
3 - 9	*	16,2	12,9984
5 - 7		11,2083	12,9984
5 - 9	*	19,0333	12,9984
7 - 9		7,825	12,9984

Nota. En la parte superior se presentan dos grupos homogéneos, en los que no existen diferencias significativas entre los valores de pH que comparten una misma columna de letras. En el segundo apartado, se señalan con un asterisco las parejas de cepas que presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95,0%, (p<0,05). Fuente: Autor.

Apéndice G

Crecimiento diametral de Trichoderma spp. a diferentes temperaturas

Tabla G1.

Seguimiento del crecimiento diametral dentro de un rango de temperatura.

Cepa	°C	Día						
		1	2	3	4	5	6	7
Th2	15	0	0	6	13	27	36	50
	20	21	29	59	90	90	90	90
	25	32	43	79	90	90	90	90
	30	25	31	49	65	76	83	90
	35	0	0	0	0	0	0	0
Th4	15	0	0	4	8	13	33	57
	20	11	20	41	80	90	90	90
	25	27	37	73	90	90	90	90
	30	22	28	46	64	77	88	90
	35	0	0	0	0	0	0	0
Th5	15	0	0	9	20	28	40	61
	20	0	12	58	75	90	90	90
	25	7	26	69	90	90	90	90
	30	6	21	35	59	78	87	89
	35	0	0	0	0	0	0	0
Th12	15	0	0	6	8	10	10	12
	20	0	5	20	47	80	87	90
	25	0	8	19	41	83	85	90
	30	5	23	35	73	86	90	90
	35	0	0	0	0	0	0	0
Th14	15	0	0	10	23	38	53	67
	20	0	19	60	88	90	90	90
	25	11	36	67	90	90	90	90
	30	9	24	39	63	77	84	87
	35	0	0	0	0	0	0	0
Th19	15	0	0	8	18	27	38	49
	20	0	17	47	72	90	90	90
	25	9	33	65	90	90	90	90
	30	10	31	58	76	90	90	90
	35	0	4	5	6	8	9	10

Nota. Mediciones medias del crecimiento diametral de las cepas dentro del rango de temperaturas ensayada (mm), 7 días. La casilla sombreada señala los valores de DC seleccionados para el análisis. Fuente: Autor.

Tabla G2

Prueba de Múltiple Rangos para el efecto de la temperatura sobre los DC; método; 95,0 porcentaje LSD.

T°	*Casos*	*Media LS*	*Sigma LS*	*Grupos Homogéneos*
35	6	1,04167	4,44368	A
15	6	15,0417	4,44368	B
30	6	66,6667	4,44368	C
20	6	75,2083	4,44368	CD
25	6	81,75	4,44368	D

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
15 - 20	*	-60,1667	13,1089
15 - 25	*	-66,7083	13,1089
15 - 30	*	-51,625	13,1089
15 - 35	*	14,0	13,1089
20 - 25		-6,54167	13,1089
20 - 30		8,54167	13,1089
20 - 35	*	74,1667	13,1089
25 - 30	*	15,0833	13,1089
25 - 35	*	80,7083	13,1089
30 - 35	*	65,625	13,1089

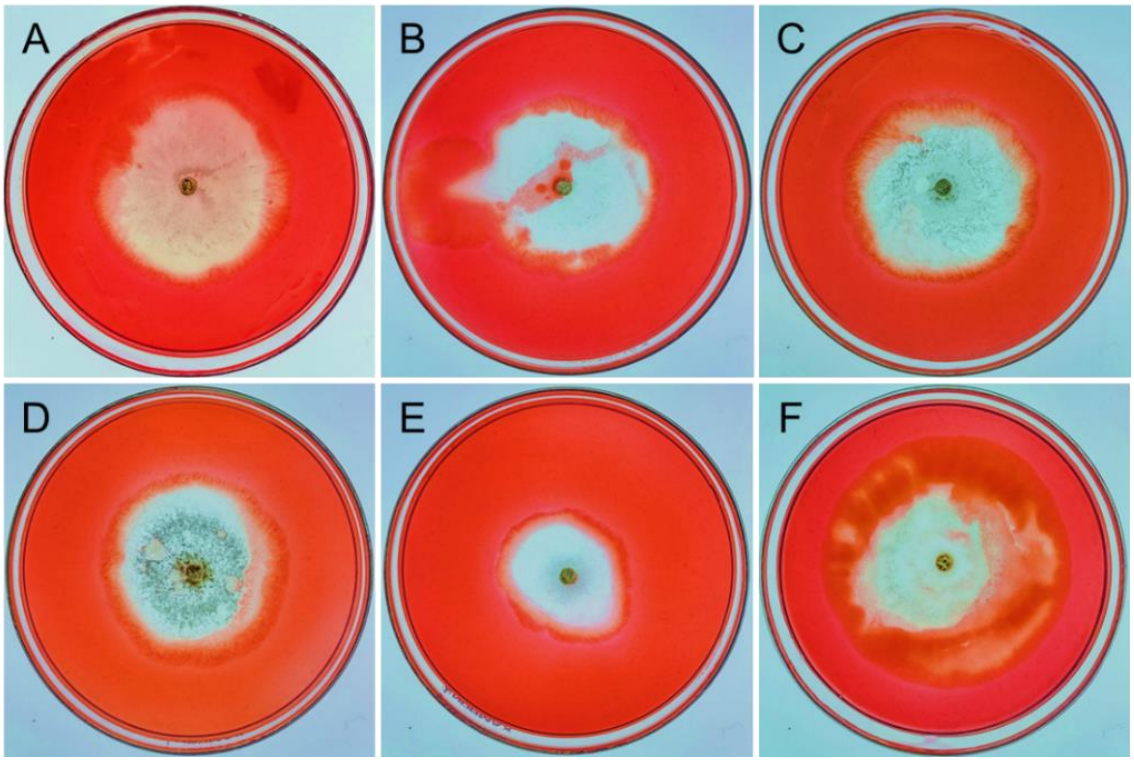
Nota. En la parte superior se presentan tres grupos homogéneos, en los que no existen diferencias significativas entre las temperaturas que comparten una misma columna de letras. En el segundo apartado, se indican con un asterisco las parejas de cepas que presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95,0%, (p<0,05). Fuente: Autor.

Apéndice H

Caracterización factores de virulencia y servicios ecosistémicos

Figura H1.

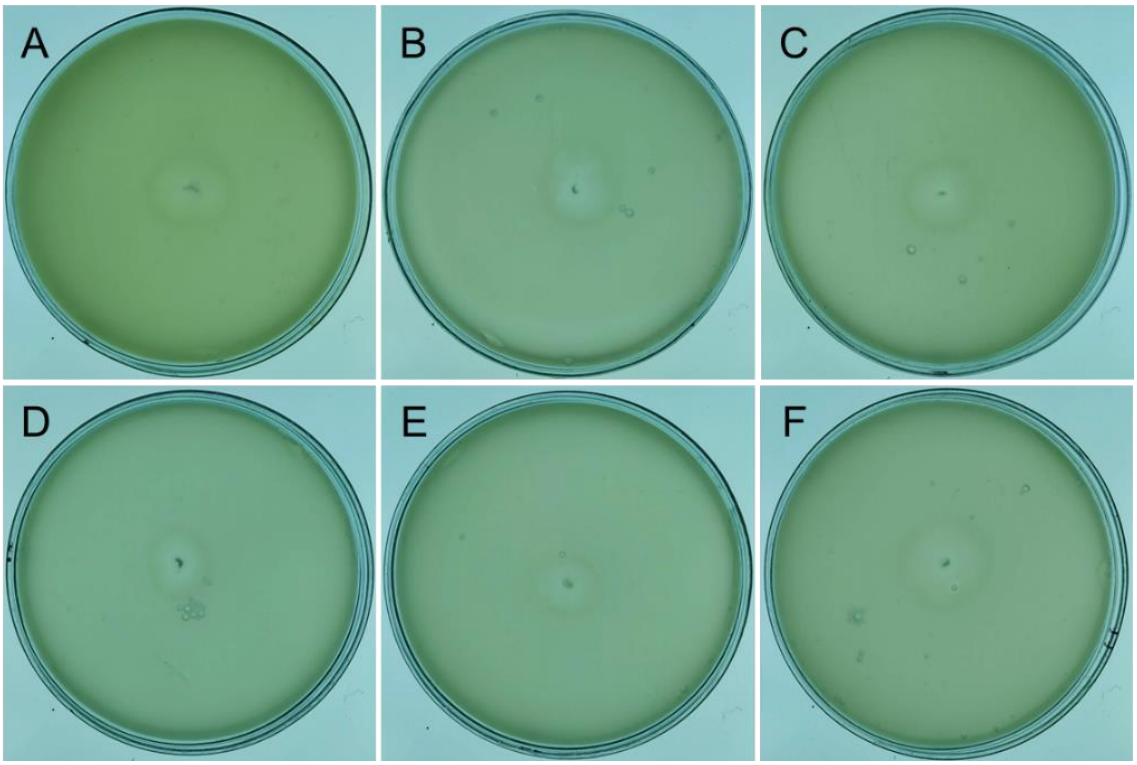
Determinación cualitativa de celulasas.



Nota. Halos formados por la degradación de celulosa en medio CMC: A. *Th2*; B. *Th4*; C. *Th5*; D. *Th12*; E. *Th14*; F. *Th19*; incubación 4 días a 25 °C. Fuente: Autor.

Figura H2

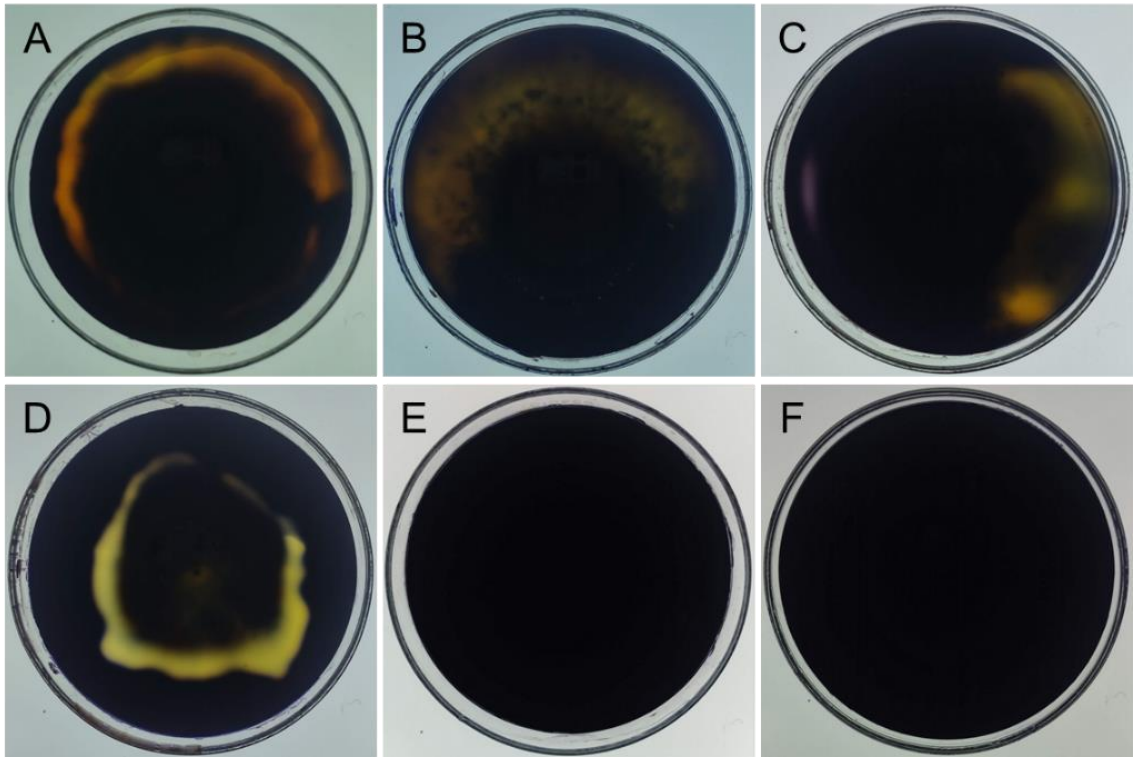
Determinación cualitativa de proteasas.



Nota. Halos desarrollados en medio SM: A. *Th2*; B. *Th4*; C. *Th5*; D. *Th12*; E. *Th14*; F. *Th19*; incubación 2días a 25 °C. Fuente: Autor.

Figura H3

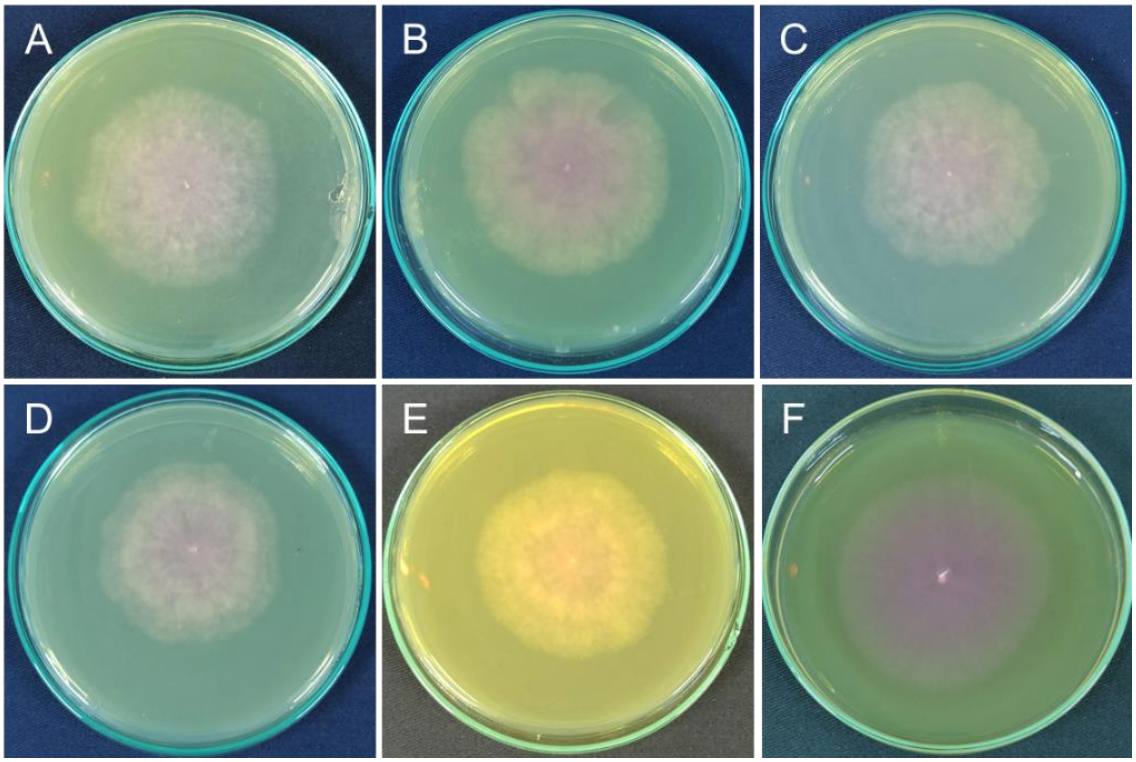
Determinación cualitativa de amilasas.



Nota. Degradación de almidón: A. *Th2*; B. *Th4*; C. *Th5*; D. *Th12*; E. *Th14*; F. *Th19*; incubación 5 días a 25 °C. Fuente: Autor.

Figura H4

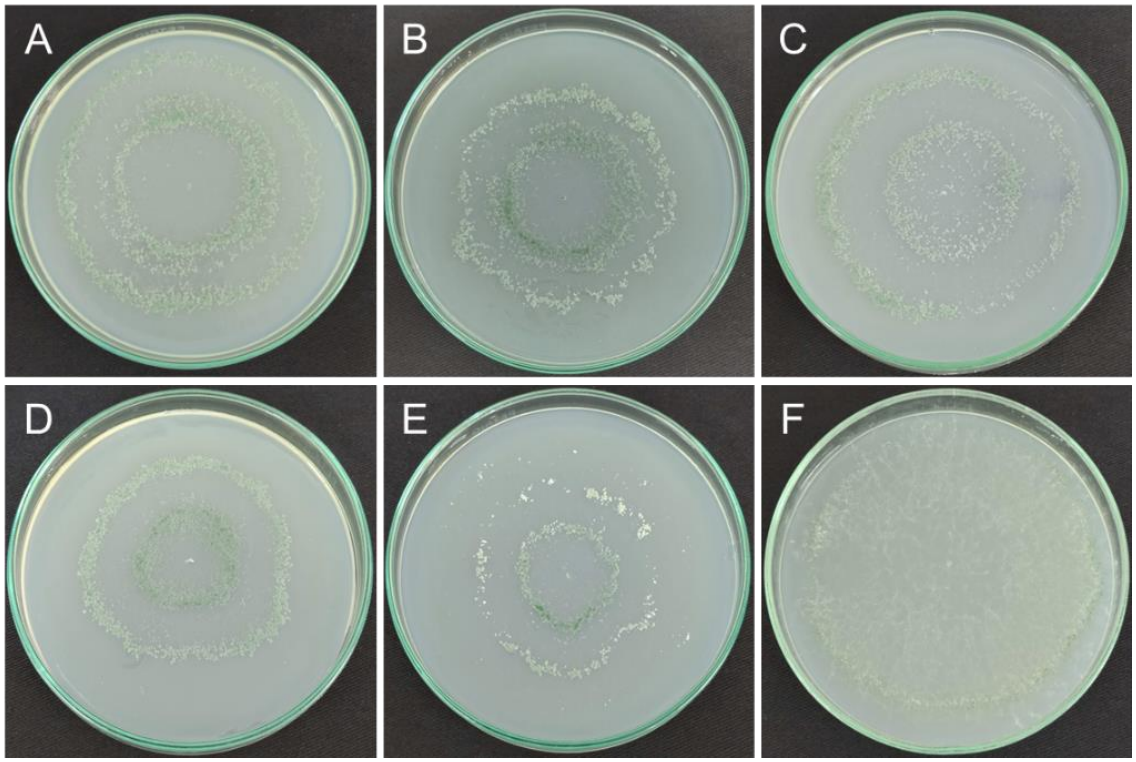
Evaluación del potencial amonificante en medio urea.



Nota. El viraje del medio indica una reacción positiva: A. *Th2*; B. *Th4*; C. *Th5*; D. *Th12*; E. *Th14*; F. *Th19*; 4 días de incubación a 25 °C. Fuente: Autor.

Figura H5

Evaluación del potencial nitrificante en medio amonio.



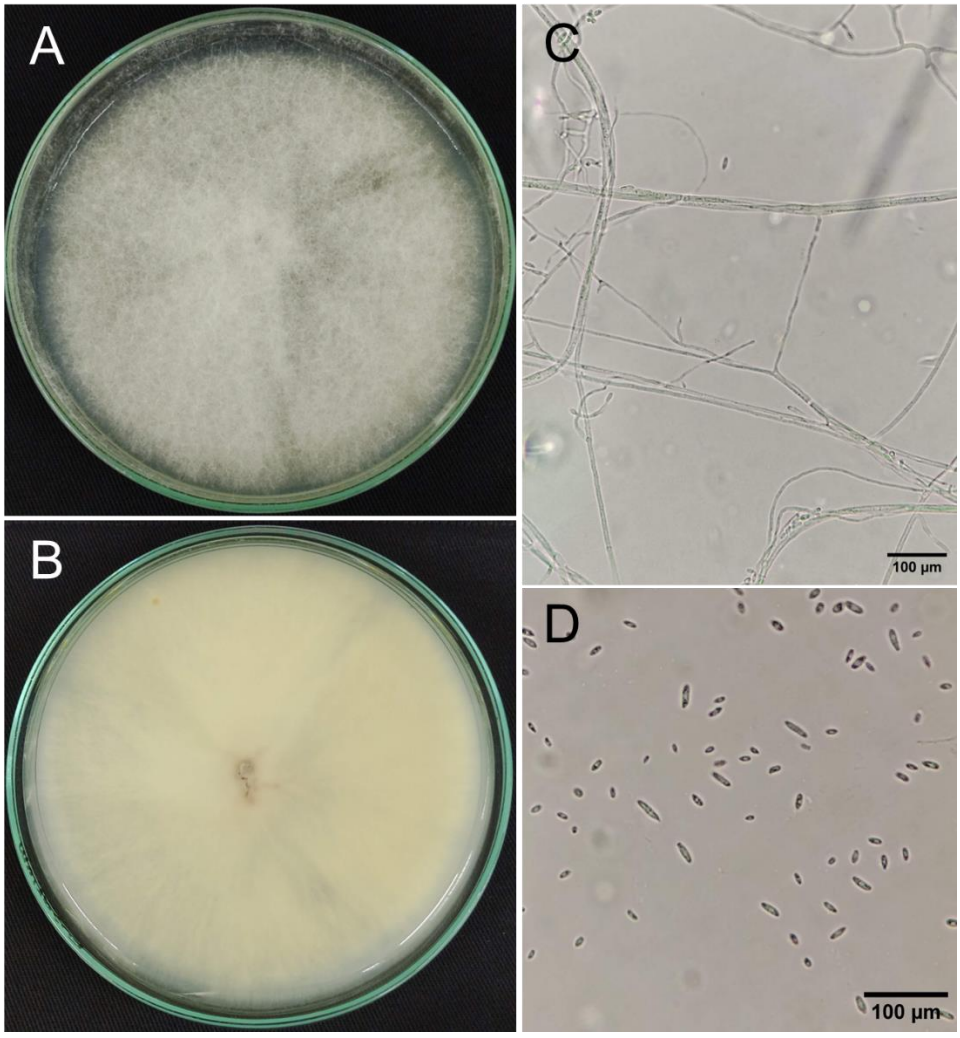
Nota. Capacidad del crecimiento en el medio amonio: A. *Th2*; B. *Th4*; C. *Th5*; D. *Th12*; E. *Th14*; F. *Th19*; incubación 7 días a 25 °C. Fuente: Autor.

Apéndice I

Características macro y microscópica de los HFP ensayados

Figura I1

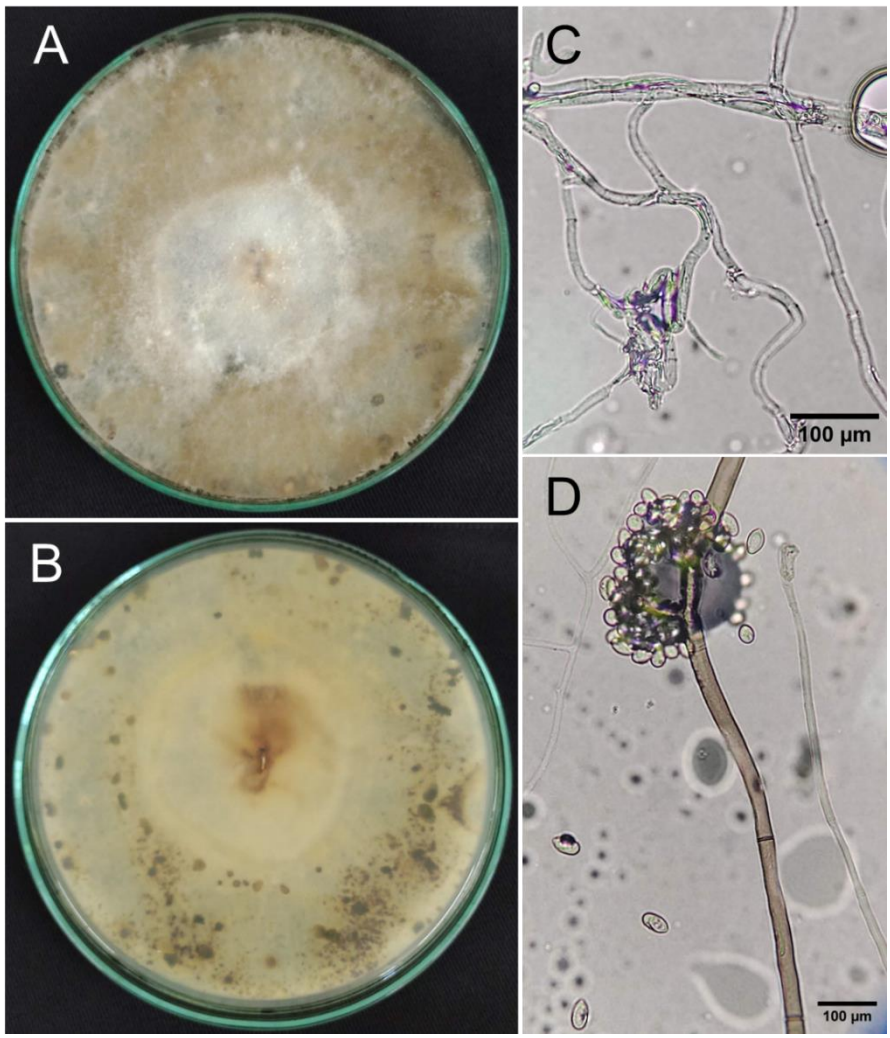
Control de desarrollo de Fusarium spp. *en PDA.*



Nota. Desarrollo habitual de *Fusarium* spp. en PDA: A. Anverso, 10 días; B. Reverso, 10 días; C. Hifas de HFP, 7 días; D. Conidios HFP 7 días. Fuente: Autor.

Figura I2.

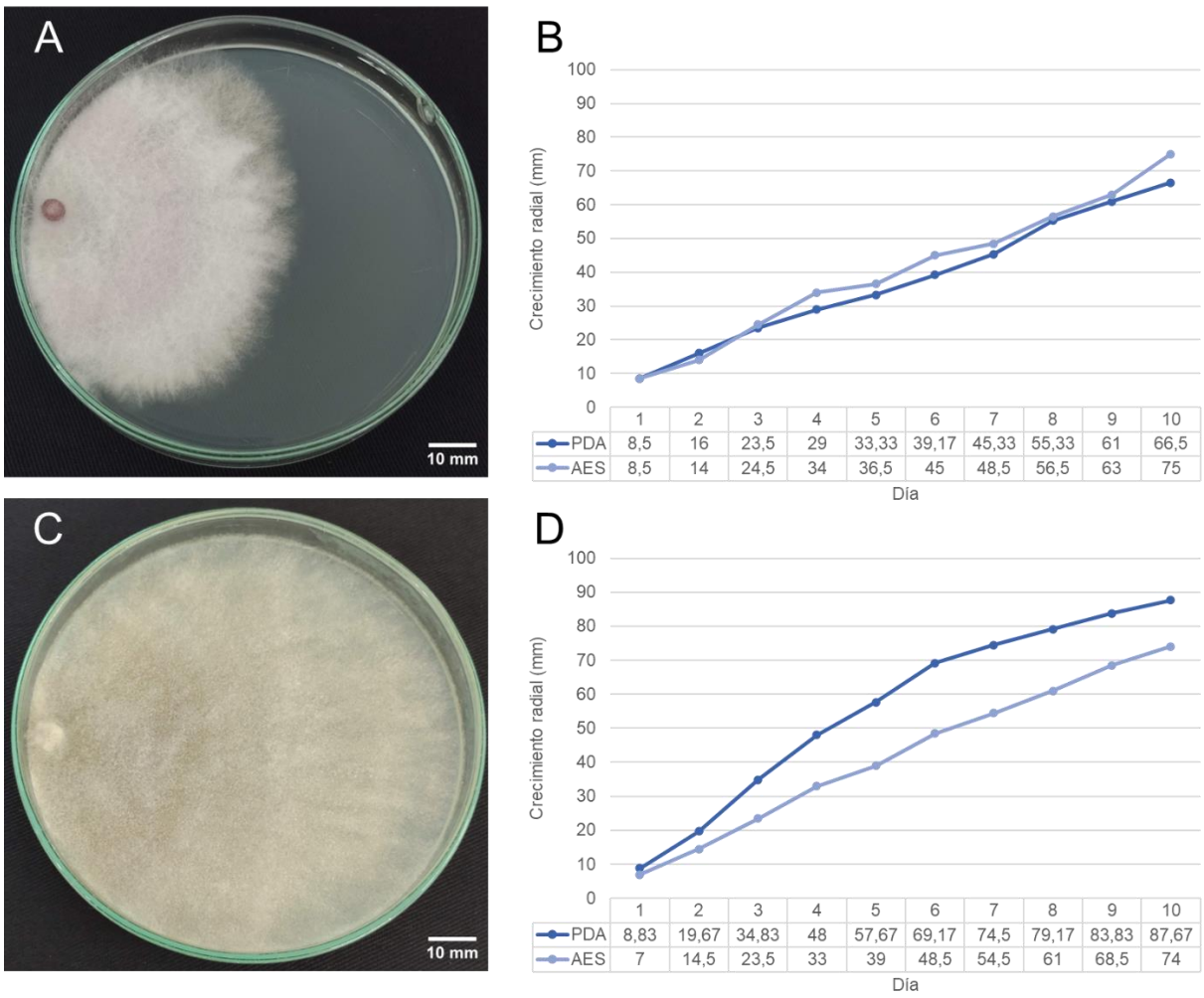
Control de desarrollo de Botrytis spp. *en PDA.*



Nota. Desarrollo habitual de *Botrytis* spp. en PDA: A. Anverso, 15 días; B. Reverso, 15 días; C. Hifas de HFP, 7 días; D. Conidios HFP 7 días. Fuente: Autor.

Figura I3.

Crecimiento radial descrito por los fitopatógenos en PDA y AES.



Nota. Testigos de los fitopatógenos frente a los que se enfrentaron las cepas de *Trichoderma* spp.: A. *Fusarium* spp., 10 días; B. Registro del crecimiento radial diario de *Fusarium* spp. en PDA y AES; C. *Botrytis* spp., 10 días; D. Registro del crecimiento radial diario de *Botrytis* spp. en PDA y AES. Fuente: Autor.

Tabla I1

Prueba de Múltiple Rangos para las VCR de los testigos; método; 95,0 porcentaje LSD.

Cepa	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
Fusarium	3	0,266667	A
Botrytis	3	0,51	B
Th19	1	0,6	BC
Th4	1	0,7	CD
Th14	1	0,72	CD
Th2	1	0,75	D
Th5	1	0,76	D
Th12	1	0,78	D

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
Botrytis - Fusarium	*	0,243333	0,0757542
Botrytis - Th12	*	-0,27	0,107133
Botrytis - Th14	*	-0,21	0,107133
Botrytis - Th19		-0,09	0,107133
Botrytis - Th2	*	-0,24	0,107133
Botrytis - Th4	*	-0,19	0,107133
Botrytis - Th5	*	-0,25	0,107133
Fusarium - Th12	*	-0,513333	0,107133
Fusarium - Th14	*	-0,453333	0,107133
Fusarium - Th19	*	-0,333333	0,107133
Fusarium - Th2	*	-0,483333	0,107133
Fusarium - Th4	*	-0,433333	0,107133
Fusarium - Th5	*	-0,493333	0,107133
Th12 - Th14		0,06	0,13121
Th12 - Th19	*	0,18	0,13121
Th12 - Th2		0,03	0,13121
Th12 - Th4		0,08	0,13121
Th12 - Th5		0,02	0,13121
Th14 - Th19		0,12	0,13121
Th14 - Th2		-0,03	0,13121
Th14 - Th4		0,02	0,13121
Th14 - Th5		-0,04	0,13121
Th19 - Th2	*	-0,15	0,13121
Th19 - Th4		-0,1	0,13121
Th19 - Th5	*	-0,16	0,13121
Th2 - Th4		0,05	0,13121
Th2 - Th5		-0,01	0,13121
Th4 - Th5		-0,06	0,13121

Nota. El apartado superior presenta cuatro grupos homogéneos, en los que no existen diferencias significativas entre las velocidades de crecimiento si comparten una misma columna de letras. En el segundo apartado, se señalan con un asterisco las parejas de cepas que presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95,0%, (p<0,05). Fuente: Autor.

Tabla I2

Prueba de Múltiple Rangos para el PICR de Fusarium spp.*; método; 95,0 porcentaje LSD.*

PICR .Cepa	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
Th19	6	56,6	A
Th14	6	59,7833	AB
Th2	6	60,9333	AB
Th12	6	62,3333	B
Th4	6	63,9	B
Th5	6	64,5	B

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
Th12 - Th14		2,55	5,2939
Th12 - Th19	*	5,73333	5,2939
Th12 - Th2		1,4	5,2939
Th12 - Th4		-1,56667	5,2939
Th12 - Th5		-2,16667	5,2939
Th14 - Th19		3,18333	5,2939
Th14 - Th2		-1,15	5,2939
Th14 - Th4		-4,11667	5,2939
Th14 - Th5		-4,71667	5,2939
Th19 - Th2		-4,33333	5,2939
Th19 - Th4	*	-7,3	5,2939
Th19 - Th5	*	-7,9	5,2939
Th2 - Th4		-2,96667	5,2939
Th2 - Th5		-3,56667	5,2939
Th4 - Th5		-0,6	5,2939

Nota. En la tabla superior se presentan dos grupos homogéneos, en los que no existen diferencias significativas entre los valores de PICR si comparten una misma columna de letras. En el segundo apartado, se indican con un asterisco las parejas de cepas que presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95,0%, (p<0,05). Fuente: Autor.

Tabla I3

Prueba de Múltiple Rangos para el PICR de Botrytis spp.*; método; 95,0 porcentaje LSD.*

PICR .Cepa	*Casos*	*Media*	*Grupos Homogéneos*
Th19	6	57,5833	A
Th12	6	62,3333	AB
Th14	6	62,6667	AB
Th4	6	64,0667	B
Th5	6	64,0667	B
Th2	6	64,25	B

Contraste	*Sig.*	*Diferencia*	*+/- Límites*
Th12 - Th14		-0,333333	5,94235
Th12 - Th19		4,75	5,94235
Th12 - Th2		-1,91667	5,94235
Th12 - Th4		-1,73333	5,94235
Th12 - Th5		-1,73333	5,94235
Th14 - Th19		5,08333	5,94235
Th14 - Th2		-1,58333	5,94235
Th14 - Th4		-1,4	5,94235
Th14 - Th5		-1,4	5,94235
Th19 - Th2	*	-6,66667	5,94235
Th19 - Th4	*	-6,48333	5,94235
Th19 - Th5	*	-6,48333	5,94235
Th2 - Th4		0,183333	5,94235
Th2 - Th5		0,183333	5,94235
Th4 - Th5		0	5,94235

Nota. En la parte superior se presentan dos grupos homogéneos, en los que no existen diferencias significativas entre los valores de PICR si comparten una misma columna de letras. En el segundo apartado, se indican con un asterisco las parejas de cepas que presentan diferencias significativas con un nivel de confianza del 95,0%, (p>0,05). Fuente: Autor.

Apéndice J

Cronograma



Apéndice K

Presentación en eventos de divulgación científica







GOBIERNO DE MÉXICO | MEDIO AMBIENTE | EDUCACIÓN

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

a

DARCY DAIMAR TOLOZA JIMÉNEZ

Por su participación con la Ponencia

"POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE TRICHODERMA, CEPAS NATIVAS DE SUELOS AGRÍCOLAS DEL MUNICIPIO DE PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER COLOMBIA"

Durante el

"1er. Congreso Virtual Internacional de Desarrollo Sustentable y Energías Alternativas"

llevado a cabo del 09 al 11 de octubre de 2023

EDUCACIÓN | INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LINARES
DIRECCIÓN

ING. HERIBERTO HERRERA COLOCIA
Presidente Honorario del Congreso

M.D. ERICKA MALDONADO PESINA
Líder de la Red Internacional de Investigación e Innovación para el Desarrollo Sostenible (RIIIDS)

12 de octubre de 2023, Linares, Nuevo León