



“Caracterización de cepas de *Trichoderma* con
potencial biocontrolador en *Solanum*
lycopersicum”

Sofia Grunale

Tesina para optar al título de Licenciada en Biotecnología

Director: Sebastián Rius

2026

Índice

Agradecimientos	3
1. Resumen	4
2. Introducción.....	5
2.1 Importancia de <i>Solanum lycopersicum</i>	5
2.2. Uso de funguicidas en plantas de Tomate	6
2.3. <i>Trichoderma</i>	8
2.4. Peptaiboles.....	10
2.5. Control de patógenos por <i>Trichoderma</i>	12
3. Hipótesis.	15
4. Objetivos.....	15
4.1. Objetivo general.	15
4.2. Objetivos específicos.....	15
5. Materiales y métodos.....	16
5.1. Preparación de cepas de <i>Trichoderma</i>	16
5.2. Medios de cultivos.....	17
5.2.1. Medio Papa-Dextrosa-Agar.	17
5.2.2. Medio agar-banana-avena-leche.	17
5.3. Caracterización macroscópica y microscópicas	18
5.4. Ensayo de enfrentamiento.	19
5.5. Análisis del perfil proteico en respuesta al enfrentamiento <i>in vitro</i> y tratamiento con peptaiboles.	20
5.5.1 Extracción de peptaiboles.	20
5.5.2. Análisis cromatográfico	21
5.6. Protección en fruto de tomate con peptaiboles totales extraídos de cepas específicas.....	22
5.7. Postulados de Koch.	22
6. Resultados.....	23
6.1. Caracterización macroscópica de patógenos	23
6.2. Caracterización microscópica de patógenos.....	24
6.3. Caracterización de cepas de <i>Trichoderma</i>	27
6.3.1. Características macroscópicas	27
6.3.2 Características microscópicas.	33
6.4. Enfrentamientos <i>in vitro</i>	38
6.4.1. Controles de patógenos.....	38
6.4.2. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp.....	39

6.4.3. Enfrentamientos <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp vs. <i>B. cinerea</i>	40
6.4.4. Enfrentamientos <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> spp vs <i>A. alternata</i>	41
6.4.5. Enfrentamientos <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> . vs <i>F. oxysporum</i>	42
6.4.6. Evaluación cinética de crecimiento	45
6.4.6.1. Evaluación cinética de crecimiento cepas de <i>Trichoderma</i>	45
6.4.6.2. Evaluación cinética de crecimiento de patógenos	47
6.4.6.3. Evaluación de cinética de crecimiento de los distintos enfrentamientos	48
6.4.6.4. Análisis de peptaiboles producidos durante los enfrentamientos.	66
6.5. Protección en fruto con peptaiboles extraídos de cepas específicas.....	75
6. Discusión.	78
7. Conclusiones.....	83
8. Bibliografía.....	86

Agradecimientos

Con la finalización de esta tesina se cierra una etapa fundamental de mi vida, una de las más intensas, desafiantes y hermosas que me tocó transitar. Este recorrido no solo implicó formación académica, sino también un profundo crecimiento personal, en el que aprendí el valor del esfuerzo, la perseverancia y la recompensa.

Nada de este camino hubiera sido posible sin el amor y el acompañamiento incondicional de mis padres, Roberto y Patricia, quienes con su crianza, compromiso y apoyo constante sentaron las bases de la persona y profesional que soy hoy. Su ejemplo, su confianza y su presencia fueron, y continúan siendo, mi mayor sostén. Este logro es también de ellos, y deseo profundamente que se sientan orgullosos.

A mi hermano Robertino, por su compañía silenciosa y sus palabras justas, tanto en los momentos difíciles como en los felices. Su apoyo a lo largo de todos estos años fue fundamental.

A mis amigos, Daiana, Carolina y Manuel, y a todas las personas que conocí durante esta etapa, quienes supieron acompañar, comprender y sostener incluso en los momentos de mayor cansancio e incertidumbre. Su presencia hizo este camino más liviano y significativo.

A mi pareja, quien durante estos años fue refugio, impulso y amor. Gracias por acompañarme con paciencia, por creer en mí incluso cuando yo dudaba, y por ayudarme a enfrentar mis miedos y reconocer mis propias capacidades.

A mi director de tesina, Dr. Sebastián Rius, por brindarme una oportunidad en un momento particularmente difícil, por abrirme las puertas del CEFOBI y por guiarme con generosidad, compromiso y calidez humana, contribuyendo de manera decisiva a mi formación como biotecnóloga.

Finalmente, agradezco profundamente a la universidad pública y, en especial, a la Universidad Nacional de Rosario, por ser un espacio de contención, enseñanza y crecimiento. A todos los docentes, compañeros y amigos que formaron parte de este recorrido, Gracias.

1. Resumen

El uso de los microorganismos como agentes de control biológico es una alternativa sustentable que ha mostrado ser efectiva en un amplio número de especies vegetales para prevenir o controlar enfermedades causadas por la infección de patógenos en las plantas cultivadas. Ampliar el conocimiento de los modos de acción de diferentes hongos y bacterias que presentan efecto antagónico sobre otros microorganismos permitiría generar productos de control biológico más eficientes para proteger a las especies de interés agronómico contra las enfermedades producidas por los fitopatógenos. Por lo tanto, la aplicación de microorganismos con capacidad para actuar como biocontrolador y al mismo tiempo, para promover el crecimiento vegetal representa una alternativa eficiente al uso de agroquímicos. En este contexto, las especies del género *Trichoderma* se han consolidado de gran interés, debido a su capacidad antagonista frente a hongos fitopatógenos mediante competencia, micoparasitismo y producción de metabolitos bioactivos, además de su potencial para inducir respuestas de defensa en las plantas. (Santone 2024). El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es susceptible a diversos patógenos fúngicos, entre los que destacan *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, causantes de importantes pérdidas de rendimiento y calidad. El objetivo de este trabajo fue caracterizar cepas autóctonas de *Trichoderma* con potencial biocontrolador frente a los principales patógenos fúngicos de tomate, bajo la hipótesis de que algunas de ellas presentan una alta capacidad antagonista asociada a la producción de metabolitos secundarios. Estos resultados comprenden las bases para el desarrollo futuro de productos bioactivos o bioinoculantes a partir de estas cepas de *Trichoderma*, lo que representaría una alternativa sustentable a la aplicación de agroquímicos

2. Introducción

2.1 Importancia de *Solanum lycopersicum*

El tomate (*Solanum lycopersicum*. L) constituye uno de los cultivos hortícolas de mayor relevancia económica a nivel mundial, siendo producido tanto para el consumo en fresco como para la industria de procesamiento. La producción global de tomate se estima en aproximadamente $1,25 \times 10^8$ toneladas anuales, distribuidas en una superficie cercana a 4,5 millones de hectáreas. Entre los principales países productores se destacan, en orden decreciente, China ($3,2 \times 10^7$ toneladas anuales), Estados Unidos, Turquía, India, Egipto, Italia, Irán, España, Brasil y México. En términos de productividad, los Países Bajos presentan los mayores rendimientos por unidad de superficie, alcanzando valores cercanos a $473 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, lo cual se atribuye principalmente a que el cultivo se desarrolla exclusivamente bajo condiciones controladas de invernadero, lo que permite optimizar los factores ambientales y el manejo agronómico (FAOSTAT, 2006) (Singh et al., 2016).

Diversos estudios han demostrado que las personas con un alto consumo de tomate presentan mejores indicadores de salud y un menor riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas. Esto se debe a que el tomate contiene importantes moléculas bioactivas, entre las que se destacan los carotenoides como el licopeno, β -caroteno (con actividad de provitamina A) y luteína, así como vitaminas tales como el ácido ascórbico (vitamina C) y los tocoferoles (vitamina E). Además, el fruto posee compuestos fenólicos, entre ellos, quercetina y naringenina (George et al., 2004). Debido a su elevado contenido de estos compuestos bioactivos, el tomate es considerado un alimento funcional o nutraceutico, ya que dichos metabolitos pueden neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS), generando efectos beneficiosos para la salud, incluyendo propiedades anticancerígenas.

Asimismo, se le atribuyen otros efectos biológicos, tales como actividad antitumorigénica, antiaterosclerótica, antiagregante plaquetaria y antihipertensiva, entre otros. (León-García et al., 2017).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño oxidativo asociado han sido implicados en la patogénesis de diversas enfermedades crónicas en humanos. En este

contexto, el licopeno es considerado uno de los antioxidantes más potentes, y se ha sugerido que puede contribuir a la prevención de la carcinogénesis y la aterogénesis, mediante la protección de biomoléculas críticas como lípidos, lipoproteínas de baja densidad (LDL), proteínas y ADN (Rao & Agarwal, 2000; Trejo-Solís et al., 2013).

Otros carotenoides presentes en el tomate, tales como α -caroteno, β -caroteno, fitoeno, fitoflueno, luteína y zeaxantina, también han demostrado ser importantes fuentes de compuestos antioxidantes, capaces de ejercer diversos efectos fisiológicos beneficiosos en el organismo (Aydemir et al., 2013).

El licopeno constituye el carotenoide más abundante en el tomate, con concentraciones que varían aproximadamente entre 0,9 y 4,2 mg por 100 g de fruto, dependiendo de la variedad. Productos derivados del tomate, como salsas y ketchup, representan fuentes concentradas de licopeno en comparación con el fruto fresco (Palozza et al., 2011). En muchos casos, la cantidad de licopeno presente en productos procesados puede ser incluso mayor que en alimentos frescos. De hecho, se estima que más del 80 % de la ingesta dietaria de licopeno en Estados Unidos proviene de productos derivados del tomate, tales como ketchup, jugo de tomate, salsa para pasta y salsa para pizza (Story et al., 2010).

2.2. Uso de fungicidas en plantas de tomate

El manejo eficaz de los patógenos de las plantas constituye una tarea fundamental para garantizar la seguridad alimentaria, la salud humana y la estabilidad social. La introducción de fungicidas sintéticos ha revolucionado la producción agrícola tanto en cantidad como en calidad, al proporcionar un control altamente efectivo de las enfermedades de las plantas (Brent & Hollomon, 2007; Lucas et al., 2015). Sin embargo, la aplicación repetida y excesiva de los mismos compuestos activos a gran escala espacial puede conducir al desarrollo de resistencia a fungicidas en las poblaciones de patógenos, reduciendo rápidamente la eficacia de estos productos para el manejo de enfermedades vegetales (Fisher et al., 2018; Hawkins & Fraaije, 2018).

Los fungicidas sintéticos pueden clasificarse en fungicidas de acción específica (*site-specific*) y fungicidas de acción no específica o multisitio (*site non-specific* o

multisite) según su modo de acción. Los fungicidas de acción específica presentan una alta actividad biológica y, en muchos casos, carácter sistémico, lo que significa que pueden ser absorbidos y distribuidos a través de los tejidos de la planta, permitiendo un control eficaz de enfermedades a dosis relativamente bajas y dirigidas a grupos específicos de hongos.

Por otro lado, los fungicidas de acción no específica presentan generalmente un espectro metabólico más amplio, lo que permite su utilización para prevenir o erradicar una mayor diversidad de patógenos vegetales (Brent & Hollomon, 2007).

La resistencia a fungicidas de acción específica puede surgir como resultado de cambios en un solo aminoácido en la proteína diana del patógeno, mientras que el desarrollo de resistencia frente a fungicidas de acción no específica suele implicar múltiples cambios nucleotídicos en varios genes del genoma del patógeno. Por esta razón, se considera que el riesgo de desarrollo de resistencia es menor en fungicidas multisitio en comparación con los fungicidas de acción específica (Brent & Hollomon, 2007).

No obstante, las mutaciones que confieren resistencia a fungicidas pueden generar costos adaptativos de aptitud biológica, reduciendo la competitividad de los patógenos en ausencia del fungicida correspondiente, debido a que las alteraciones en el ADN pueden afectar funciones celulares y bioquímicas esenciales (Andersson & Levin, 1999; Melnyk et al., 2015). En consecuencia, la implementación adecuada de fungicidas en prácticas agrícolas, mediante la mezcla o rotación de compuestos con diferentes modos de acción, se considera una estrategia eficaz para reducir la presión de selección sobre las poblaciones de patógenos y retrasar el desarrollo de resistencia en campo (Lucas et al., 2015).

Las poblaciones de patógenos que desarrollan resistencia a un fungicida pueden, en algunos casos, presentar simultáneamente resistencia a uno o varios fungicidas adicionales, fenómeno conocido como resistencia cruzada. Generalmente, este tipo de resistencia se observa entre fungicidas que comparten el mismo modo de acción (Brent, 1995; Deising et al., 2008). Por ejemplo, *Alternaria alternata*, agente causal del tizón foliar del pistacho, ha mostrado resistencia cruzada a difenoconazol, propiconazol y

tebuconazol, todos ellos fungicidas que actúan mediante la inhibición de la desmetilación (DMI) (Yang et al., 2019).

Sin embargo, la resistencia cruzada también puede ocurrir entre fungicidas con diferentes modos de acción. Este fenómeno suele estar asociado a mecanismos celulares que limitan la acumulación intracelular de los compuestos activos, como el aumento de la expresión de transportadores de eflujo, mecanismos de detoxificación o reducción en la captación del fungicida. Por ejemplo, la sobreexpresión de genes que codifican transportadores de eflujo ha permitido que el hongo responsable del moho gris, *B. cinerea*, desarrolle resistencia simultánea a un amplio espectro de fungicidas (Kretschmer et al., 2009).

2.3. *Trichoderma*

Las especies del género de ascomicetos filamentosos *Trichoderma* se encuentran entre los hongos saprotróficos más comúnmente aislados. Se encuentran con frecuencia en el suelo y creciendo sobre madera, corteza, otros hongos e innumerables sustratos, lo que demuestra su alto potencial oportunista y su adaptabilidad a diversas condiciones ecológicas (Kubicek et al., 2008; Druzhinina et al., 2006; Harman et al., 2004; Mukherjee et al., 2013).

La nomenclatura de estos hongos es compleja debido a su pleiomorfismo, ya que algunos pueden existir en dos estados morfológica y fisiológicamente diferentes. La fase sexual (teleomórfica) se conoce con el nombre genérico *Hypocrea*, mientras que la fase asexual (anamórfica o mitospórica) se denomina *Trichoderma*; por ello, ambos se consideran conjuntamente como *Hypocrea/Trichoderma* (Druzhinina et al., 2006; Mukherjee et al., 2013).

Aunque varias especies comunes han perdido su capacidad de reproducirse sexualmente y se han convertido en especies clonales, como *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma parareesei*, la mayor parte de la diversidad genética del género está representada por formas sexuales (Druzhinina et al., 2006; Kubicek et al., 2008). La mayoría de los cuerpos fructíferos de *Hypocrea spp.* se encuentran asociados con hongos basidiomicetos específicos. Por ejemplo, algunas

especies crecen exclusivamente sobre géneros como *Hymenochaete*, *Fomes*, *Fomitopsis* y *Piptoporus* (Kubicek et al., 2008).

Las especies micoparasíticas de *Hypocrea/Trichoderma* pueden degradar y crecer dentro de estructuras de resistencia (esclerocios) producidas por diversos hongos fitopatógenos, entre ellos *Sclerotinia spp.*, *Typhula spp.*, *Macrophomina phaseolina* y *Verticillium dahliae* (Harman et al., 2004).

Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que *Hypocrea* y otros miembros del orden *Hypocreales* evolucionaron originalmente como asociados biótrophos de hongos degradadores de madera y posteriormente colonizaron la madera como un nicho ecológico adicional (Rossman et al., 1999). Algunas especies, como *Hypocrea jecorina* / *Trichoderma reesei*, un importante productor industrial de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, podrían haber evolucionado hacia la utilización de madera previamente degradada en lugar de parasitar directamente al hongo hospedador (Kubicek et al., 2008).

Por lo tanto, la capacidad de antagonizar, parasitar o incluso eliminar otros hongos parece estar ampliamente distribuida entre las especies de *Hypocrea/Trichoderma*, lo que llevó a investigadores e industria a evaluar y utilizar cepas de este género para el control biológico de patógenos de plantas (Harman et al., 2004; Mukherjee et al., 2013). Aunque el género *Hypocrea/Trichoderma* comprende numerosas especies, gran parte de la investigación sobre micoparasitismo se ha centrado en unas pocas especies, como *T. harzianum*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma asperelloides* (Harman et al., 2004; Mukherjee et al., 2013).

Durante dichos estudios se observó que cepas utilizadas en biocontrol pueden establecerse en la rizosfera, estimular el crecimiento vegetal e inducir respuestas de defensa en las plantas frente a patógenos (Harman et al., 2004; Mukherjee et al., 2013). Además, algunas cepas han sido aisladas como endófitos, es decir, como colonizadores de los espacios intercelulares de los tejidos vegetales (Harman et al., 2004). La secuenciación reciente de los genomas de especies ampliamente utilizadas en biocontrol, como *T. atroviride* y *T. virens*, junto con el desarrollo de tecnologías ómicas,

ha proporcionado nuevos conocimientos sobre la ecología del género y la evolución de sus características (Kubicek et al., 2011; Mukherjee et al., 2013).

Estas especies constituyen herramientas eficaces para el control biológico debido a la producción y secreción de enzimas líticas degradadoras de la pared celular, su capacidad de colonización radicular, la competencia por nutrientes, la inducción de resistencia sistémica en las plantas y la producción de un amplio espectro de metabolitos secundarios, entre los que se destacan alcaloides, flavonoides, fenoles, esteroides, y terpenoides, sideróforos y peptaiboles (Parveen et al., 2026).

2.4. Peptaiboles

Los peptaiboles son péptidos lineales con entre 5 y 20 residuos de aminoácidos, producidos por peptaibol sintetazas, que pertenecen al grupo de enzimas sintetazas de péptidos no ribosomales (NRPS) (Degenkolb et al., 2008; Marik et al., 2019). La presencia de aminoácidos inusuales como α -aminoisobutírico (Aib) e isovalina (Iva), junto con un extremo C hidroxilado y aminoácidos N-terminales acetilados, constituye una característica distintiva de este grupo de péptidos antimicrobianos (Degenkolb et al., 2008). La estructura de las enzimas NRPS determina el orden de los aminoácidos en los peptaiboles (Marik et al., 2019). Los módulos de las NRPS son semi-autónomos y capaces de activar, elongar y ensamblar los aminoácidos. Estos módulos contienen dominios de adenilación (A), tiolación (T) y condensación (C), que en conjunto representan una unidad mínima repetitiva de las NRPS (Degenkolb et al., 2008; Marik et al., 2019). El orden de estas unidades determina finalmente la estructura primaria de los peptaiboles. La primera NRPS de *Trichoderma* reportada fue *tex1*, descrita en *T. virens* (Mukherjee et al., 2011). Aunque las especies de *Trichoderma* son conocidas como los principales productores de peptaiboles, estos compuestos también han sido reportados en especies de *Acremonium*, *Tylopilus*, *Boletus*, *Bionectria*, *Paecilomyces*, *Emericellopsis*, *Cephalosporium*, *Stilbella*, *Gliocladium* y *Tolypocladium* (Degenkolb et al., 2008).

Las actividades antimicrobianas de los peptaiboles se han reportado contra diversos hongos, bacterias Gram positivas e incluso virus. Algunos ejemplos incluyen trichorzianinas A y B, trichorzinas HA y harzianinas HC producidas por *T. harzianum*,

trichokoninas de *Trichoderma koningii*, tricholonginas BI y BII y longibraquinas de *Trichoderma longibrachiatum*, así como trichotoxinas de *T. asperellum*, todos los cuales han demostrado actividad antimicrobiana (Degenkolb et al., 2008; Marik et al., 2019). Las trichotoxinas son peptaiboles de 18 residuos de aminoácidos, siendo trichotoxin-A 40 el primero identificado en *Trichoderma viride* NRRL5242 (Brückner & Przybylski, 1984). Posteriormente se describieron trichotoxin-A-50 y otras variantes en *T. viride* y *T. harzianum* (Brückner & Przybylski, 1984; Degenkolb et al., 2008). Estos autores clasificaron las trichotoxinas en dos subgrupos: neutras (A-50) y ácidas (A-40), diferenciadas por el residuo Gln17 o Glu17, que determina si la molécula es neutra o ácida.

Las longibraquinas son peptaiboles de 20 residuos identificados en *Trichoderma longibrachiatum*, que también se clasifican según el intercambio Gln18/Glu18 en subgrupos neutros (longibrachin-A) y ácidos (longibrachin-B) (Degenkolb et al., 2008). El modo de acción de los peptaiboles se basa en sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Degenkolb et al., 2008). Estos compuestos son capaces de formar canales iónicos dependientes de voltaje en las membranas plasmáticas, aumentando la permeabilidad de la membrana y provocando finalmente la muerte celular por fuga citoplasmática (Degenkolb et al., 2008; Marik et al., 2019). La aplicación exógena de peptaiboles también puede aumentar la resistencia de las plantas frente a patógenos al activar respuestas de defensa vegetal (Viterbo et al., 2007). Por ejemplo, las trichokoninas inducen resistencia en tabaco frente al virus del mosaico del tabaco (TMV) (Shi et al., 2012).

Además, en plántulas de pepino, la aplicación de dos isoformas sintéticas de peptaiboles de 18 residuos (TvBI y TvBII) provenientes de *T. virens* Gv29-8 desencadenó resistencia sistémica inducida contra bacterias fitopatógenas de las hojas, lo que sugiere que los peptaiboles de 18 residuos pueden actuar como inductores de respuestas de defensa no específicas del cultivar (Engelberth et al., 2000).

También se ha reportado un efecto sinérgico entre los peptaiboles y las enzimas hidrolíticas de la pared celular producidas por *Trichoderma* durante la reacción antagonista frente a *B. cinerea* (Lorito et al., 1996; Schirmböck et al., 1994). Estos estudios demostraron que los peptaiboles inhiben la actividad de la β -glucano sintasa en el hongo hospedador y actúan sinérgicamente con β -glucanasas, lo que explica la

destrucción de la pared celular del patógeno por especies de *Trichoderma*. Además, los peptaiboles también han sido considerados elicitores de las defensas vegetales (Engelberth et al., 2000).

2.5. Control de patógenos por *Trichoderma*

El micoparasitismo es una forma de interacción biotrófica en la que los hongos parásitos permanecen vivos a expensas de otros hongos hospedadores. La comercialización exitosa de varios agentes de control biológico basados en *Trichoderma* dependió en gran medida de su capacidad micoparasítica para detectar, antagonizar o eliminar a otros hongos (Harman et al., 2004; Lorito et al., 2010). A través de diferentes mecanismos como la competencia, la antibiosis y el micoparasitismo, *Trichoderma* puede antagonizar directamente a los patógenos de las plantas, aliviando el estrés biótico asociado y proporcionando condiciones de crecimiento más saludables a las plantas (Harman et al., 2004; Druzhinina et al., 2011).

El proceso de micoparasitismo parece ser muy complejo y compartido por varias especies de *Trichoderma*; sin embargo, involucra etapas específicas del hospedador que incluyen, en primer lugar, la detección del hongo hospedador y, posteriormente, la liberación de un conjunto de enzimas hidrolíticas y metabolitos secundarios micotóxicos (Lorito et al., 2010). Diversos estudios genómicos centrados en investigar la naturaleza y los mecanismos del micoparasitismo revelaron que algunas especies poseen arsenales más amplios de genes que codifican enzimas hidrolíticas y compuestos antifúngicos, lo que podría explicar, al menos parcialmente, la variabilidad en la eficacia del control biológico observada entre diferentes especies de *Trichoderma* (Kubicek et al., 2011; Druzhinina et al., 2011).

A nivel molecular, un factor crucial para el micoparasitismo exitoso es la detección temprana de señales del hospedador. Se han analizado los mecanismos moleculares subyacentes a la activación de la maquinaria de biocontrol en *Trichoderma*, y el modelo actualmente aceptado sugiere que las enzimas líticas y los metabolitos secundarios antimicrobianos producidos por *Trichoderma*, en combinación con la formación de estructuras de infección, son desencadenados por la presencia de los antagonistas de *Trichoderma* (Zeilinger et al., 2016). Dicha activación solo puede tener lugar después de

que *Trichoderma* percibe señales externas derivadas del hospedador (por ejemplo, componentes de la pared celular del hospedador o metabolitos secretados) o experimenta una interacción física con ligandos localizados en la superficie del hospedador. Tanto *T. atroviride* como *T. virens* respondieron a *Rhizoctonia solani* incluso antes de cualquier contacto físico, mediante la activación de genes relacionados con el micoparasitismo, lo que respalda la hipótesis de que sustancias difusibles liberadas por el hospedador desencadenan la respuesta antagonista del agente de control biológico (Seidl et al., 2009).

Al analizar distintas cepas de *Trichoderma* spp., se obtuvieron compuestos no volátiles que presentaron actividad antifúngica frente a *F. oxysporum*, *A. alternata* y *B. cinerea* (Li et al., 2019). Nueve compuestos fueron obtenidos a partir de *Trichoderma* sp., siendo el compuesto etiquetado como 31 el que exhibió mayor actividad frente a *A. alternata*, con un valor de Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de 32 µg/mL (Li et al., 2019).

Una nueva lactona macrocíclica de 10 miembros denominada cremenólido fue aislada de *Trichoderma cremeum*. Los ensayos *in vitro* demostraron que el cremenólido inhibió el crecimiento radial del micelio de *F. oxysporum*, *B. cinerea* y *Rhizoctonia solani*, y además promovió significativamente el crecimiento de plántulas de tomate (Vinale et al., 2016). El compuesto 6-pentil- α -pirona también fue aislado de *T. harzianum* T77 y SQR-T037. Este compuesto se utiliza para el control de enfermedades del tronco de la vid y mostró actividad antifúngica frente a *F. oxysporum* (Vinale et al., 2008; Lorito et al., 2010). A partir de lo expuesto, se hace evidente que la eficacia de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico radica en la complejidad y sinergia de sus mecanismos de defensa, donde los metabolitos secundarios desempeñan un papel crítico (Zeilinger et al., 2016).

Bajo esta premisa, el presente trabajo se fundamenta en la hipótesis de que cepas autóctonas de *Trichoderma*, aisladas de entornos locales, poseen una alta capacidad antagonista vinculada a una producción eficiente de metabolitos secundarios. En consecuencia, el objetivo general de esta investigación es caracterizar morfológicamente dichas cepas, evaluando su potencial biocontrolador frente a *B. cinerea*, *A. alternata* y

F. oxysporum, a fin de sentar las bases para el desarrollo de bioinsumos sustentables que optimicen la sanidad del cultivo de tomate.

3. Hipótesis.

“Determinadas cepas de Trichoderma, aisladas de entornos locales, poseen una alta capacidad antagonista contra patógenos de tomate vinculada a una producción de metabolitos secundarios”.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Explorar las capacidades de *Trichoderma* como controlador biológico de enfermedades causadas por fitopatógenos en tomate.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Evaluarla capacidad antagónica de diferentes cepas de *Trichoderma* contra patógenos fúngicos de tomate *in vitro*.

4.2.2. Analizar la incidencia de enfermedad causada por *B. cinerea* en frutos de tomates.

4.2.3. Evaluar la producción de metabolitos secundarios por las cepas seleccionadas como posibles compuestos antifúngicos.

4.2.4. Analizar el espectro de acción de los metabolitos secundarios frente a patógenos.

5. Materiales y métodos

5.1. Preparación de cepas de *Trichoderma*

Las cepas de *Trichoderma* forman parte de la colección del Laboratorio de Fisiología de la Interacción Planta-Microorganismo del Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI) y se conservaron en el Centro de Referencia Micológica (CEREMIC) de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario. Fueron aisladas de muestras de suelo recogidas en la parte sur de la provincia de Santa Fe, en la región pampeana (32°25'00" S, 61°54'00" O), con permiso de colecta n° 255/2018, expediente 02101-0019157-3 de acuerdo al Protocolo de Nagoya.

Para el aislamiento se utilizó la metodología definida por Zhou et al., (2020) (modificada), donde se tomó un gramo de suelo/muestra y se lo colocó en 9 mL de agua esterilizada para obtener una solución de suelo de 1×10^{-1} . Partiendo de esa suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta la 1×10^{-6} . Para sembrarse en 5 placas de Petri con medio de cultivo PDA y cloranfenicol 0.1g/L y se incubaron por 72 horas. Los crecimientos con características a *Trichoderma spp.*, se los transfirió a papa dextrosa agar (PDA), utilizando el procedimiento de punta de hifa (Dou et al., 2019), se logró cultivos monoconidiales los cuales se los conservó en tubos Eppendorf en refrigeración -80°C.

Se trabajó con ocho cepas nativas previamente aisladas y conservadas en el cepario del laboratorio. Las cepas utilizadas en este trabajo fueron denominadas:

<i>T. afroharzianum</i> 3A3
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR5
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR12
<i>T. afroharzianum</i> J66
<i>T. afroharzianum</i> J50
<i>T. afroharzianum</i> 10BR1
<i>Trichoderma spp</i> Pista 9
<i>Trichoderma spp</i> 20NAR3

Tabla 1: Cepas utilizadas Se tomaron muestras de suelo recogidas en la parte sur de la provincia de Santa Fe, en la región pampeana (32°25'00" S, 61°54'00" O), con permiso de colecta n° 255/2018, expediente 02101-0019157-3 de acuerdo al Protocolo de Nagoya y siguiendo el protocolo (Zhou et al., 2020). Se conservaron en medio líquido a -80 °C y se sembraron en placas de Petri con medio PDA de 90 mm, utilizando 0,1 mL de inóculo por placa. La incubación se realizó a 25 °C bajo un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad durante 7 días.

Las cepas conservadas en medio líquido a -80 °C se sembraron en placas de Petri con medio agar papa dextrosa (PDA) de 90 mm, utilizando 0,1 mL de inóculo por placa. La incubación se realizó a 25 °C bajo un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad durante 7 días. Posteriormente, se transfirió un disco de 7 mm del extremo en crecimiento de la placa, a un nuevo medio PDA para asegurar la pureza y viabilidad del cultivo.

Finalmente, se cosecharon los conidios y se conservaron en glicerol estéril (50% v/v) a -80 °C para su uso en las siguientes etapas.

5.2. Medios de cultivos.

5.2.1. Medio Papa-Dextrosa-Agar.

El medio de cultivo utilizado para cultivo en medio sólido, tanto las cepas fitopatógenas, como *Trichoderma* fue el PDA (Britania) de concentración 39 g/L, (infusión de papa 200 g/L, glucosa 20 g/L, agar 15 g/L) y se ajustó a pH final: 5.6 ± 0.2 . Se disolvieron 39 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Se dejó reposar durante 5 minutos y se calentó hasta ebullición con agitación continua hasta disolución total. Luego se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.2.2. Medio agar-banana-avena-leche.

Para activar la esporulación se realizó la siembra de discos de 7mm de los fitopatógenos en el medio casero que contiene agar, banana, leche y avena. El medio

contiene 1,5% p/v Agar bacteriófago, 20 g de banana, 20 g de avena y 200 mL de leche entera en polvo.

5.3. Caracterización macroscópica y microscópicas

Tras el período de incubación, se evaluaron las características macroscópicas (color, textura, tamaño y pigmentación de las colonias) y se registraron fotográficamente.

La caracterización microscópica se realizó mediante microcultivos en agar Lactrimiel según la técnica de Ridell (Lacaz et al., 2002). Se cortó la placa con medio de Lactimiel con hoja de bisturí, en cuadrados de 1mm. Con la hoja de bisturí se colocó un cuadrado en el portaobjetos que está en la placa con el equipo de micro cultivo. Se sembró el hongo con el ansa de punta en las cuatro esquinas y en el centro del bloque. Por último, se colocó el cubreobjetos sobre el bloque de Lactimiel.

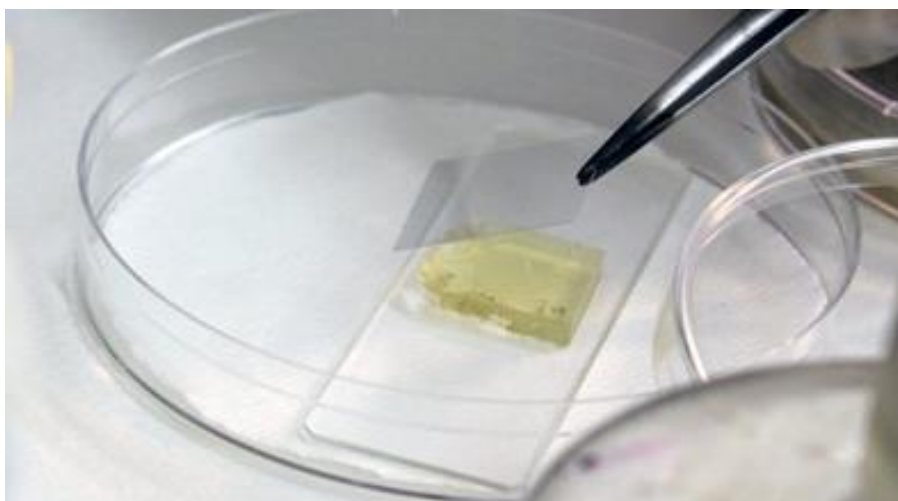


Figura 1: Técnica de Riddell: Se cortó de la placa con medio Lactrimiel con hoja de bisturí, cuadrados de 1mm. Con la espátula o la hoja de bisturí se colocó un cuadrado en el portaobjetos que está en la placa de Petri con el papel filtro y el portaobjeto. Se sembró el hongo con el ansa de punta en las cuatro esquinas y en el centro del bloque. Se colocó el cubreobjetos sobre el bloque de Lactrimiel durante 10 días a 25°C.

El medio Lactrimiel está compuesto por harina de trigo 20 g/L, leche descremada 10 g/L, miel 10 g/L y agar bacteriológico 15 g/L (Lacaz et al., 2002).

Luego del período de incubación de una semana en un fotoperiodo 12 hs luz/ 12 hs de oscuridad de los fitopatógenos y las cepas de *Trichoderma*, se tomó el cubreobjetos y se le colocó una gota de azul de metileno 1% p/v sobre el mismo. Las observaciones se llevaron a cabo con un microscopio de campo claro con objetivos 10X y 40X en un microscopio Nikon Labophot-2 con cámara digital MC500W-G1.

5.4. Ensayo de enfrentamiento.

La actividad antagónica de las ocho cepas de *Trichoderma* se evaluó frente a *F. oxysporum*, *B. cinerea* y *A. alternata* mediante la técnica de cultivos duales en placas de PDA. Se utilizaron discos de 7 mm de diámetro tomados de la periferia activa de los cultivos de *Trichoderma* y del patógeno, colocándolos a una distancia de 7 cm en la misma placa. Las placas se incubaron durante 7 días a 25 °C. Tres días antes se sembró los fitopatógenos debido a su crecimiento más lento. Se midió el crecimiento radial promedio de ambos organismos con el paso de los días. Se realizaron medidas desde el centro del disco sembrado hacia los laterales y hacia el centro de la placa, se promedió los tres valores y se repitió, para cada día, durante 3 días.

Se registraron y clasificaron las interacciones antagónicas según los criterios propuestos por Badalyan et al. (2004) y Molla et al. (2001).

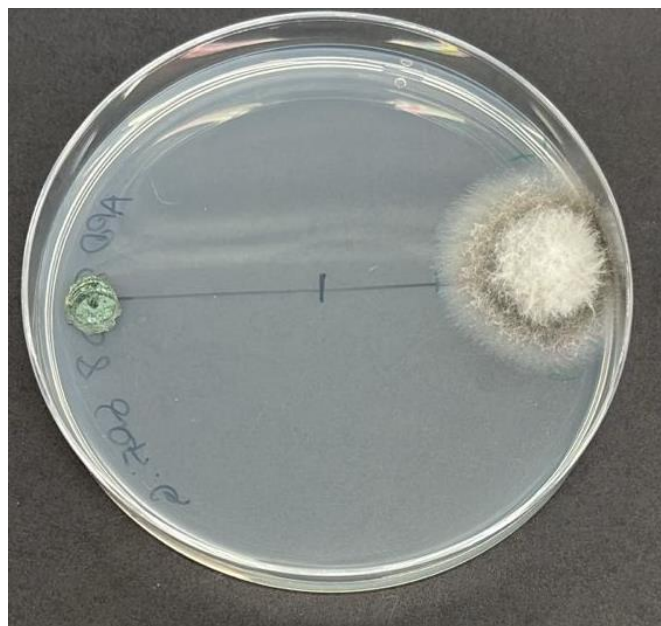


Figura 2. Enfrentamiento *in vitro*. Se colocó en una placa de Petri con medio PDA dos discos de 7 mm provenientes del borde correspondiente al crecimiento activo de la cepa de *Trichoderma* y del patógeno analizados. *A. alternata* y *F. oxysporum* se sembraron 3 días antes debido a su crecimiento más lento, las placas se resguardaron en cámara a 25°C durante 7 días.

5.5. Análisis del perfil proteico en respuesta al enfrentamiento *in vitro* y tratamiento con peptaiboles.

5.5.1 Extracción de peptaiboles.

La extracción de peptaiboles se realizó a partir de los enfrentamientos *in vitro* en medio PDA entre una cepa de *Trichoderma* y un fitopatógeno. Además, ambos fueron crecidos de manera individual para ser utilizados como control. Se adicionaron 5 mL de cloroformo a cada placa de Petri, y se realizó dos lavados con 1 mL, se recolectó el halo de inhibición (Figura 1) en tubos de ensayo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 hs. Los tubos fueron centrifugados a $10000 \times g$ durante 10 min.

Luego el sobrenadante se evaporó hasta sequedad mediante rotavapor (40 °C, 20 rpm), SENCO R206B (Shanghai Senco Technology Co., Ltd.). Los extractos totales se disolvieron en metanol y se transfirieron a nuevos tubos que luego se evaporó bajo una corriente de N₂(g). El material seco remanente se disolvió en 200 µL de metanol y se conservó en -20°C para análisis posteriores (Rahimi et al., 2020). (Figura 2.)

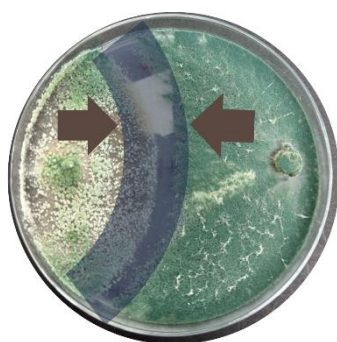
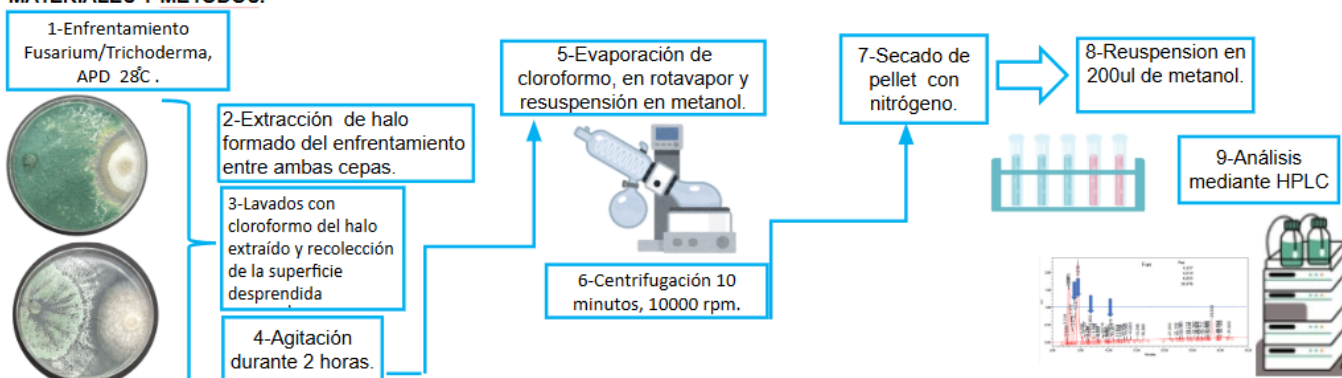


Figura 3: Zona tomada para la extracción de peptaiboles totales de enfrentamiento entre *Trichoderma* y patógeno. Entre las flechas se indica el halo de inhibición. El PDA correspondiente fue cortado con bisturí para su posterior procesamiento.

Figura 4: Protocolo seguido para la extracción de peptaiboles totales. 1-Enfrentamiento *Fusarium/Trichoderma*, PDA 28°C. 2-Extracción del halo formado del enfrentamiento *Trichoderma*-patógeno. 3-Lavados con cloroformo del halo extraído y recolección de la superficie desprendida. 4- Agitación durante 2 hs del halo de inhibición. 5- Evaporación en cloroformo en rotavapor y re suspensión en metanol. 6- Centrifugación durante 10 min a 1000 rpm. 7-Secado de pellet con N₂ (g). 8- Re suspensión en 200 µL de metanol. 9- Análisis mediante HPLC.

5.5.2. Análisis cromatográfico

MATERIALES Y METODOS.



Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 (PerkinElmer) equipado con un detector de arreglo de diodos (PDA, Altus A10 PDA Detector) con detección a 220nm. La separación se efectuó en una columna de fase reversa C18 (Phenomenex Luna, 250 mm × 4,6 mm de diámetro interno, 5 µm de tamaño de partícula). La fase móvil estuvo compuesta por agua con 0,1 % de ácido fórmico (solvente B) y metanol con 0,1 % de ácido fórmico (solvente C), empleándose un modo de elución en gradiente. El programa de gradiente comenzó a tiempo 0 min con una composición de 30 % de solvente B y 70 % de solvente C; a los 16 min la proporción se modificó a 15 % de solvente B y 85 % de solvente C; posteriormente, a los 25 min se alcanzó una composición de 100 % de solvente C, condición que se mantuvo hasta los 35 min de corrida. El flujo se estableció en 1 mL min⁻¹ durante todo el análisis, con límites de presión fijados entre 400 y 4000 psi (Rahimi et al., 2020).

5.6. Protección en fruto de tomate con peptaiboles totales extraídos de cepas específicas

Se tomaron veintidós tomates Cherry los cuales fueron previamente esterilizados durante 3 minutos en solución de 2% v/v de hipoclorito de sodio, enjuagados 2 veces con H₂O destilada estéril y secados en flujo laminar durante 5 minutos, a los cuales se le realizó a cada uno tres cruces sobre el epicarpio con aguja hipodérmica estéril (de 0.5 cm cada una) en flujo laminar y se le suministró 5 μ L del extracto de peptaiboles en cada una de ellas. Luego de 5 minutos, se les agregaron 5 μ L en cada una de las cruces con el patógeno *B. cinerea*. Los frutos fueron colocados en placas de Petri de vidrio, en una bandeja con papel húmedo y se les cubrió con film para el seguimiento diario del progreso de la infección durante cinco días.

5.7. Postulados de Koch

Para corroborar que la infección observada en los frutos de tomate pertenece a *B. cinerea*, a partir de los tomates que presentaron síntomas de este patógeno se recolectó con ansa de punta el micelio y se colocó en el centro de una placa de Petri con medio de cultivo PDA. A partir de ello se realizó la verificación morfológica de la cepa patogénica macro y microscópicamente cultivándola durante 10 días a 25° C .

A tomaron 4 tomates Cherry, los cuáles se encontraban sanos y desinfectados, se les aplicó, en incisiones de 5 mm en forma de cruz realizadas con bisturí, 5 μ L de una solución 1×10^6 esporas/mL proveniente de la placa mencionada anteriormente. Se colocó a cada uno de los tomates en placa de Petri de vidrio con papeles de filtro humedecidos con 3 mL de agua estéril.

Luego de 3 días a 25 °C con humedad y fotoperiodo 12hs luz/12hs oscuridad, los tomates presentaron micelio e hifas grises, síntomas de la enfermedad, los cuáles fueron recolectados con ansa de punta colocados en el centro de placas de Petri con medio de cultivo PDA. Las mismas se conservaron en cámara durante 10 días a 25 °C con un fotoperiodo de 12hs luz/12hs oscuridad. A continuación, se colocaron 5mL de agua estéril en cada placa y se removió el micelio y las esporas con espátula de Drigalsky, se recolectó el sobrenadante en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se realizó el conteo de esporas en microscopio óptico de campo claro con aumentos 10X y 40X (Microscopio

Nikon Labophot-2 con cámara MC500W-G1). Generando así una solución de 1×10^6 esporas/mL de *B. cinerea*.

Se repitió el procedimiento con 4 tomates Cherry sanos: 3 incisiones de 5mm en forma de cruz, en cada una se aplicaron 5µL de la solución de esporas y se colocó a cada uno en placa de Petri de vidrio con papeles de filtro humedecidos con agua estéril. Se los reservó 10 días a 25 °C con humedad y fotoperiodo 12hs luz/12hs oscuridad. Los tomates presentaron síntomas de enfermedad, los mismos fueron recolectados y colocados en placas de Petri con medio de cultivo PDA, se cultivaron 10 días con el mismo fotoperiodo mencionado, a 25 °C. Se observaron las características macroscópicas.

Se trabajó en cabina de bioseguridad debido al uso de fitopatógenos.

6. Resultados

6.1. Caracterización macroscópica de patógenos

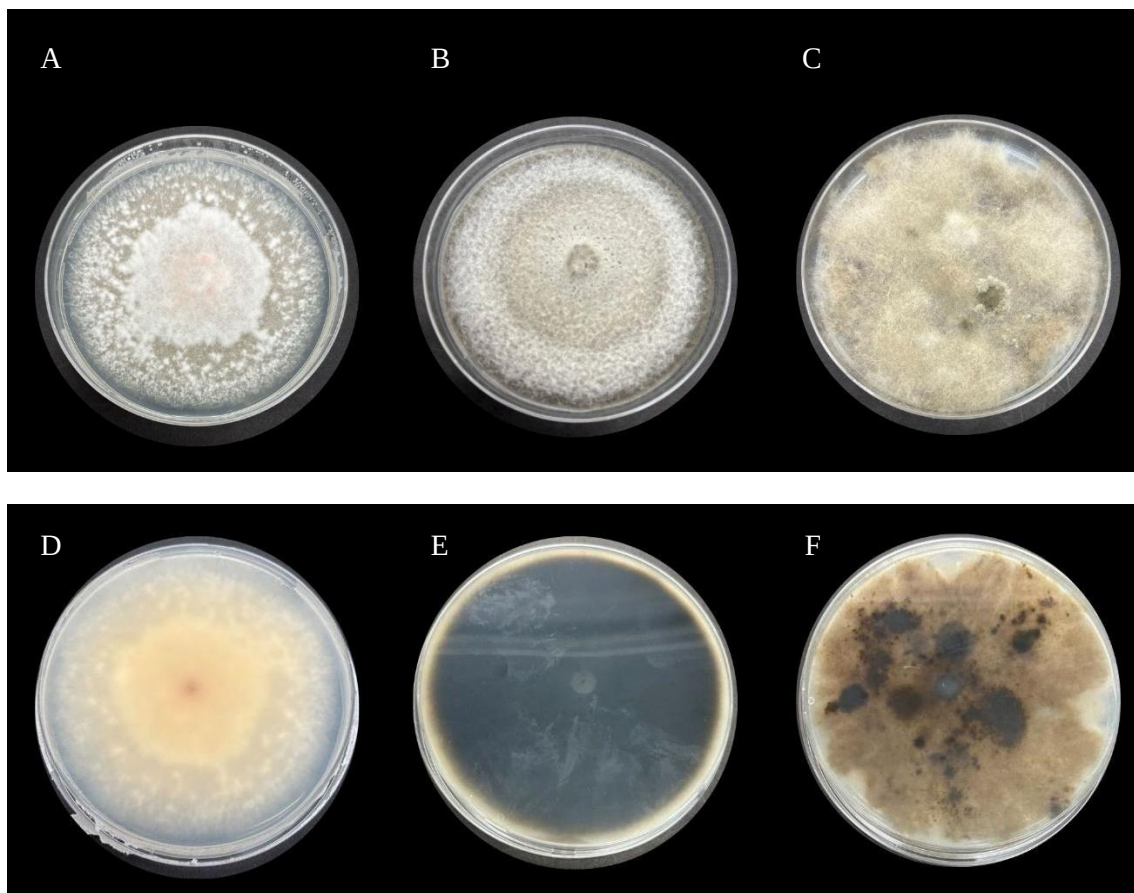


Figura 5: Patógenos. Se tomó un disco de 7mm del extremo en crecimiento de las placas de cada patógeno cultivados en el cepario del laboratorio y fue colocado en el centro de la placa de Petri en medio PDA a 28°C. Se mantuvo distinto tiempo de crecimiento para cada patógeno debido a las diferencias en velocidades de crecimiento. *F. oxysporum* crecida durante 7 días (A, D). *A. alternata* crecida durante 10 días (B, E). *B. cinerea* crecida durante 10 días. (C, F) Anverso (A, B, C), reverso (D, E, F).

En primer lugar, se realizó la caracterización de los patógenos de tomate para corroborar su identidad. Luego de haberlos crecido durante el tiempo necesario para que ocuparan toda la superficie de la placa se procedió a la caracterización macroscópica. Se tomó un disco de 7mm del extremo en crecimiento de las placas de cada patógeno cultivados en el cepario del laboratorio y fue colocado en el centro de la placa de Petri en medio PDA a 28°C. Cada patógeno crece a velocidades distintas, por esta razón se cultivaron durante cierto tiempo cada uno. *F. oxysporum* siendo el patógeno de crecimiento más rápido, a los 7 días ya se encontraba cubriendo toda la placa de Petri. En cambio *B. cinerea* y *A. alternata* se necesitó 10 días para que cubran toda la superficie. Se observaron diferencias en el tamaño y la coloración de las colonias correspondientes a los patógenos analizados. *F. oxysporum* presentó una coloración rosada típica en la región central de la colonia, la cual se atenuó progresivamente hacia la periferia (Fig. 5A, anverso), adquiriendo finalmente una tonalidad blanquecina con una superficie lisa a levemente radiada de aspecto algodonoso, micelio aéreo abundante, crecimiento homogéneo con pigmentación central típica del género.

Por otro lado, *A. Alternata* presenta un aspecto aterciopelado a yesoso de color marrón-grisáceo (Fig. 5B, anverso) y marrón oscuro a negro (Fig. 5E, reverso), una colonia compacta, oscura, con poco micelio aéreo.

Por último, se puede observar en la Figura 5C una superficie radiada de aspecto algodonoso de color gris claro a gris amarillento (anverso) y pardo claro (reverso) con un micelio aéreo abundante típico de *B. cinerea*.

6.2. Caracterización microscópica de patógenos

El análisis microscópico de las imágenes obtenidas permitió identificar diferencias en la morfología y el tamaño de las estructuras reproductivas de los patógenos estudiados. La micrografía muestra estructuras características del hongo fitopatológico *A.*

alternata, presentando una conidiogénesis de tipo holoblástica, produciendo dictioconidios muriformes de morfología obclavada (Fig. 6). Dichas estructuras de propagación se disponen en cadenas acropétalas a partir de hifas de micelio septado. (Pitt & Hocking, 2009)

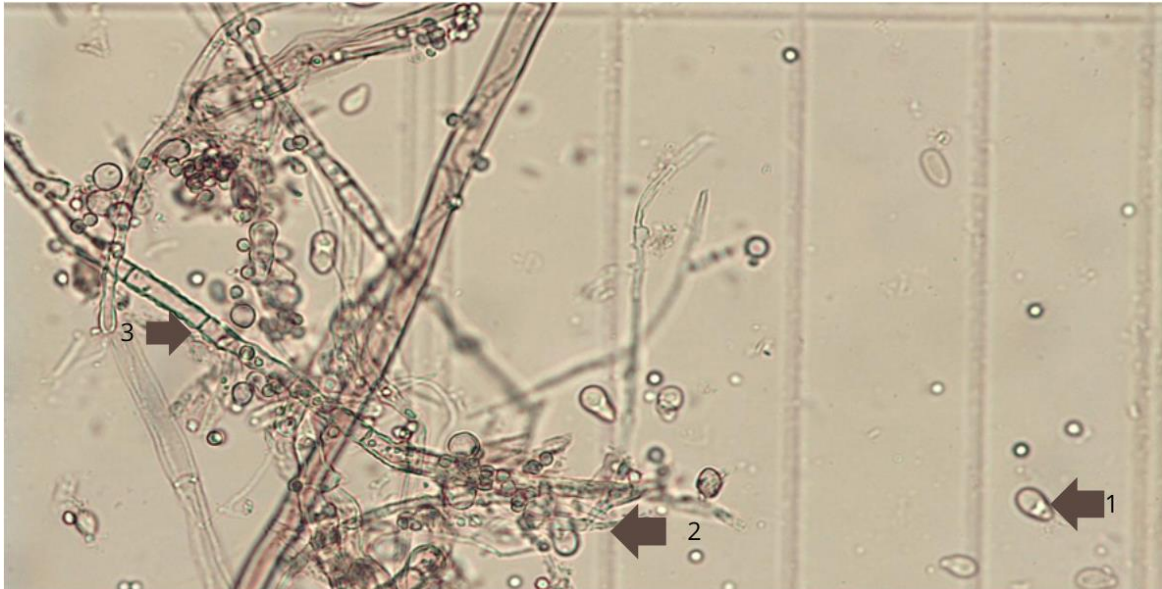


Figura 6: Imagen del micelio y esporas de *A. alternata*. Obtenidas en microscopio óptico (40X). (1) Dictioconidio muriforme de morfología obclavada. (2) Cadena acropétala. (3) Micelio Septado. (Pitt & Hocking, 2009).

Por otro lado, el análisis microscópico de los aislamientos de *F. oxysporum* reveló la presencia de un micelio septado, en el cual el proceso de reproducción asexual ocurre mediante una conidiogénesis blástica de tipo enteroblástica (Fig.7). En las muestras se identificaron tres tipos de estructuras características del complejo: en primer lugar, los macroconidios, que se presentan como esporas hialinas, multicelulares y con una morfología fusiforme con extremos curvados. En segundo lugar, se observaron abundantes microconidios elipsoidales, generalmente unicelulares, dispersos en torno a las fiálides. Finalmente, se detectó la formación de clamidoconidios a partir del micelio.

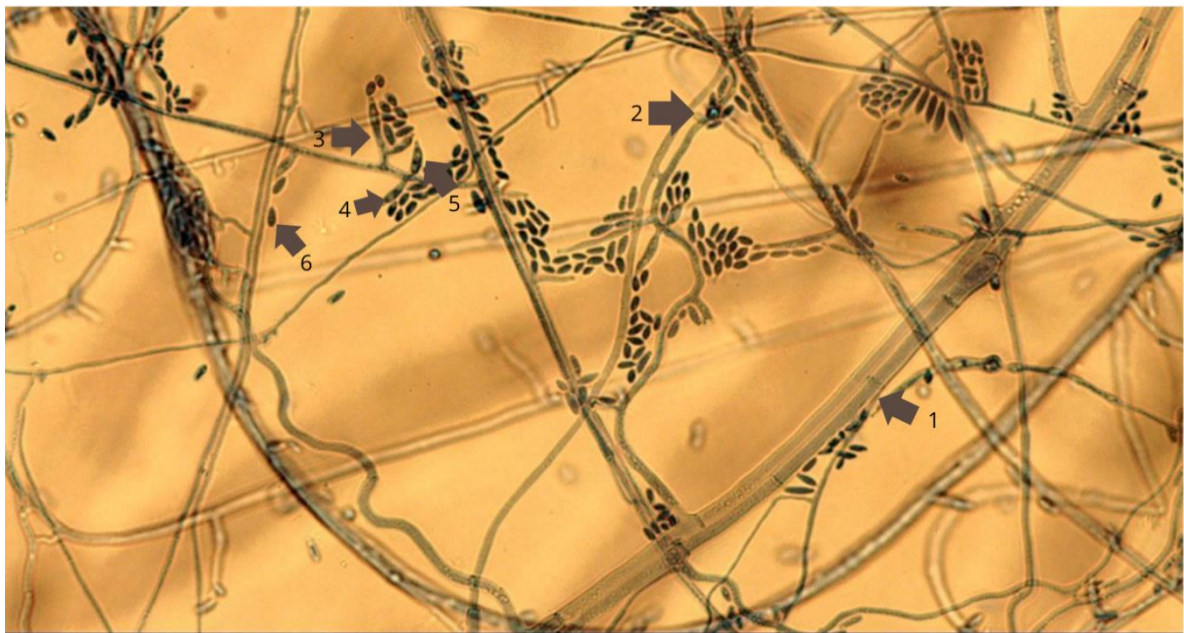


Figura 7. Imagen del micelio y esporas de *F. oxysporum*. Obtenidas en microscopio óptico (40X). (1) Micelio septado. (2) Clamidoconidio. (3,4,5) Macroconidios. (6) Microconidios. (Pitt & Hocking, 2009).

El análisis microscópico de *B. cinerea* (Fig. 8) permitió identificar un micelio tabicado conformado por hifas que presentan ramificaciones características. La estrategia de reproducción asexual se manifiesta mediante el desarrollo de conidióforos largos y ramificados en su sección apical, donde ocurre una conidiogénesis blástica de tipo holoblástica, los conidios se originan de forma sincrónica a partir de células conidiógenas ampuliformes localizadas en los extremos de las ramificaciones, dando lugar a estructuras unicelulares, hialinas y de morfología elipsoidal. Esta disposición final genera una estructura de tipo botrioide, en forma de racimo, la cual constituye el rasgo taxonómico distintivo para la identificación de este género fúngico. (Pitt & Hocking, 2009).

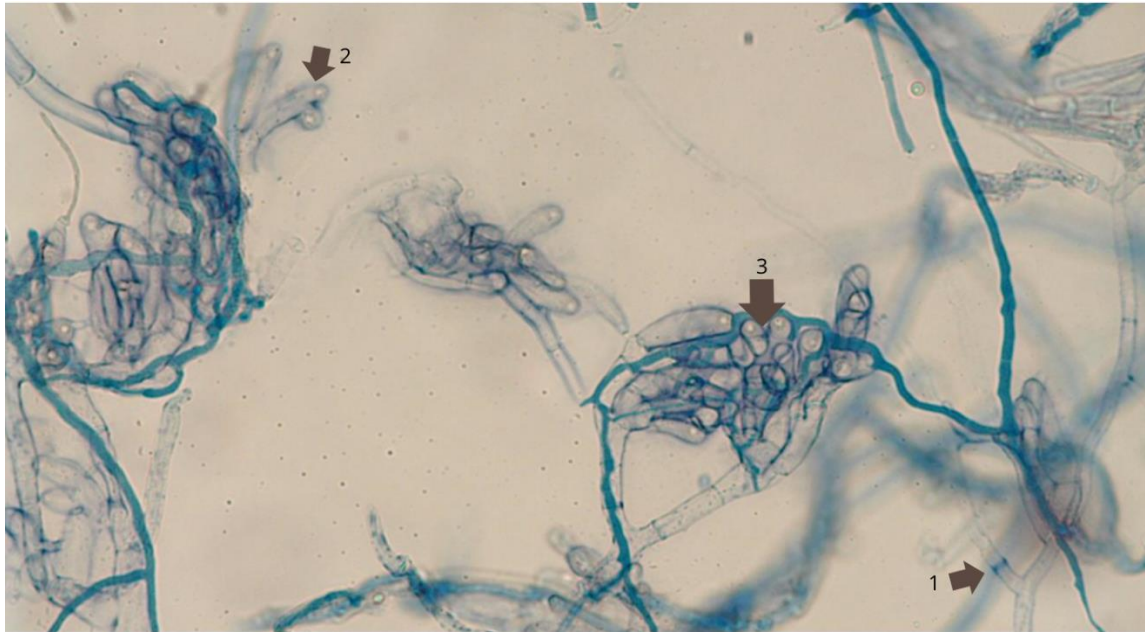


Figura 8: Imagen del micelio y esporas de *B. cinerea*. Obtenidas en microscopio óptico (40X), tinción con azul de metileno y técnica de Riddell. (1) Micelio septado. (2) Células conidiógenas ampuliformes localizadas en los extremos de las ramificaciones. (3) Estructura de tipo botrioide, en forma de racimo. (Pitt & Hocking, 2009).

6.3. Caracterización de cepas de *Trichoderma*

6.3.1. Características macroscópicas

Las ocho cepas de *Trichoderma* seleccionadas para este trabajo de tesina fueron caracterizadas macroscópicamente luego de ser crecidas en medio de cultivo PDA durante 4 días. Una característica típica de *Trichoderma* es su rápido crecimiento en condiciones favorables, lo que resulta una ventaja al momento de colonizar espacios y competir por nutrientes en la rizosfera de las plantas (Calumby et al. 2025).

Al finalizar el período de incubación, se evaluaron las características macroscópicas, las cuales se compararon con las descripciones reportadas en la literatura para confirmar su clasificación dentro del género *Trichoderma*. Las características macroscópicas evaluadas incluyeron la forma, la elevación, el margen, la superficie y la pigmentación (Calumby et al., 2025; Chaverri et al., 2015; Barnett y Hunter, 1972).

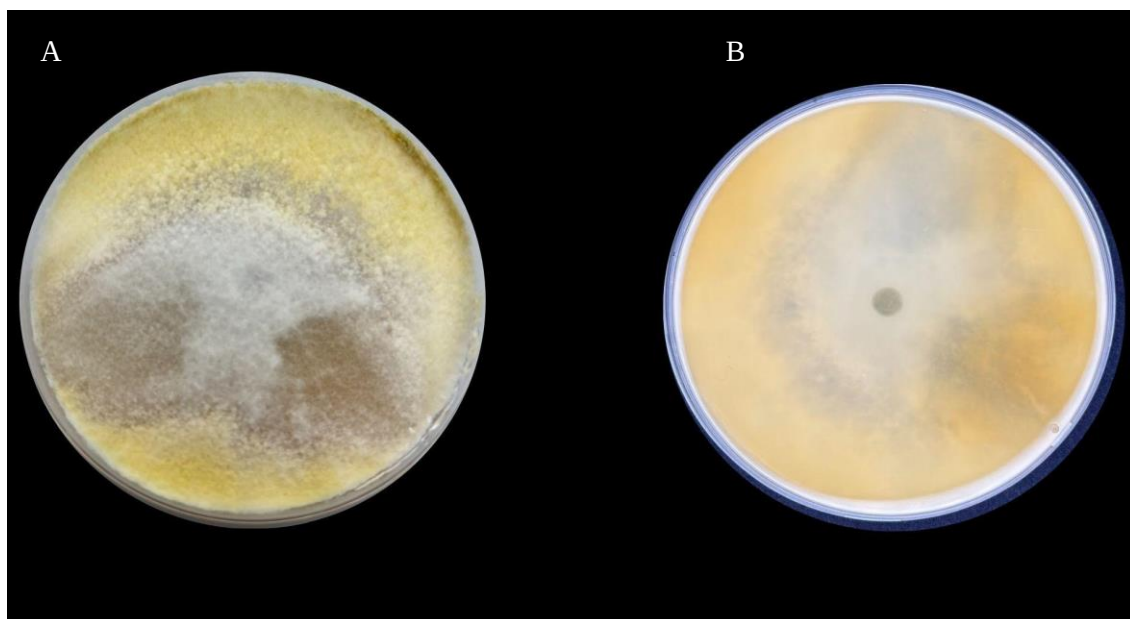


Figura 9: Cepa *T. afroharzianum* UEPAAR5. Cepa cultivada en medio PDA durante 4 días a 28°C. Sembrada a partir de un disco de 7mm tomado del extremo en crecimiento de una placa de Petri de *T. afroharzianum* UEPAAR5 (A: anverso; B: reverso).

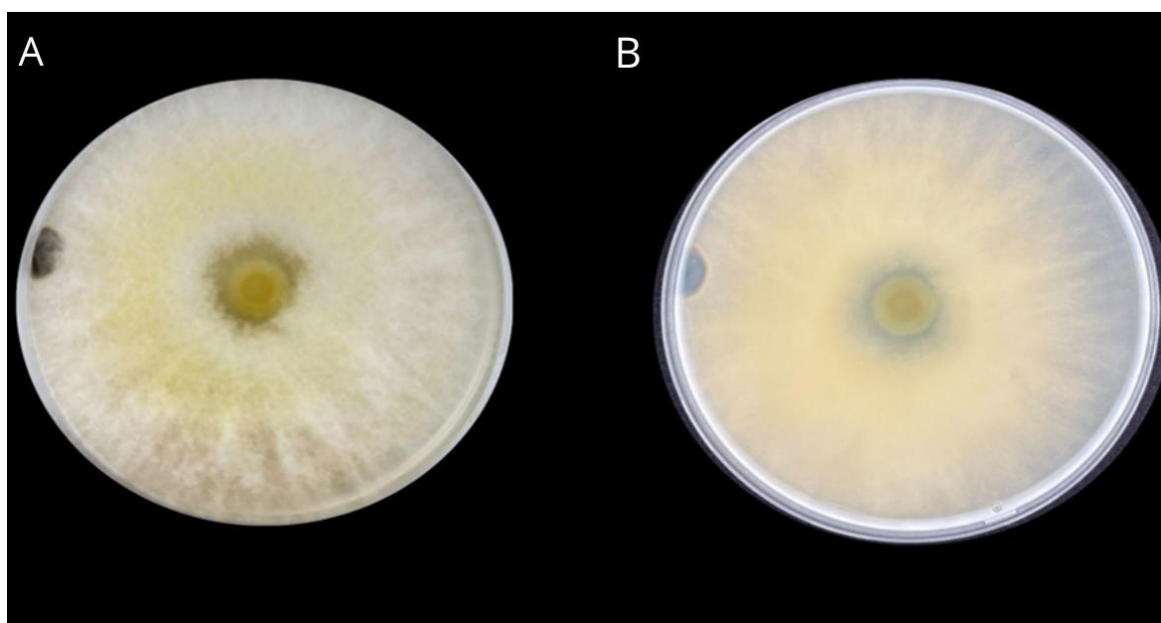


Figura 10: cepa *Trichoderma* spp 20NAR3. Cepa cultivada en medio PDA durante 4 días a 28°C. Sembrada a partir de un disco de 7mm tomado del extremo en crecimiento de una placa de Petri de *Trichoderma* spp 20NAR3 (A: anverso; B: reverso).

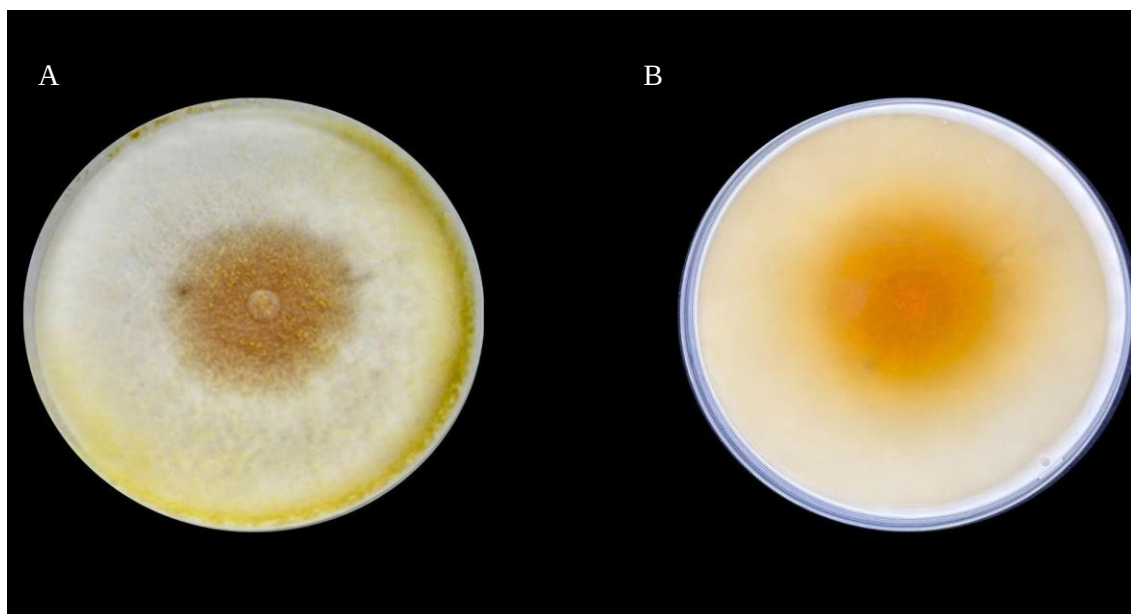


Figura 11: Ceba *T. afroharzianum* 10BR1. Ceba cultivada en medio PDA durante 4 días a 28°C. Sembrada a partir de un disco de 7mm tomado del extremo en crecimiento de una placa de Petri de *T. afroharzianum* 10BR1 (A: anverso; B: reverso).

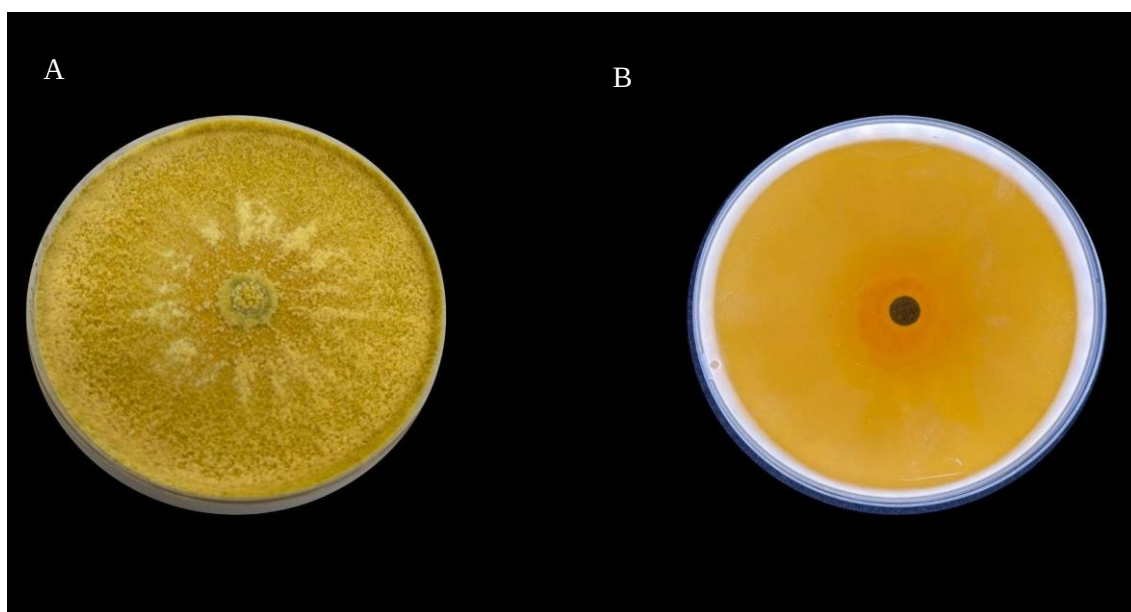


Figura 12: Ceba *T. afroharzianum* J66. Ceba cultivada en medio PDA durante 4 días a 28°C. Sembrada a partir de un disco de 7mm tomado del extremo en crecimiento de una placa de Petri de *T. afroharzianum* J66 (A: anverso; B: reverso).

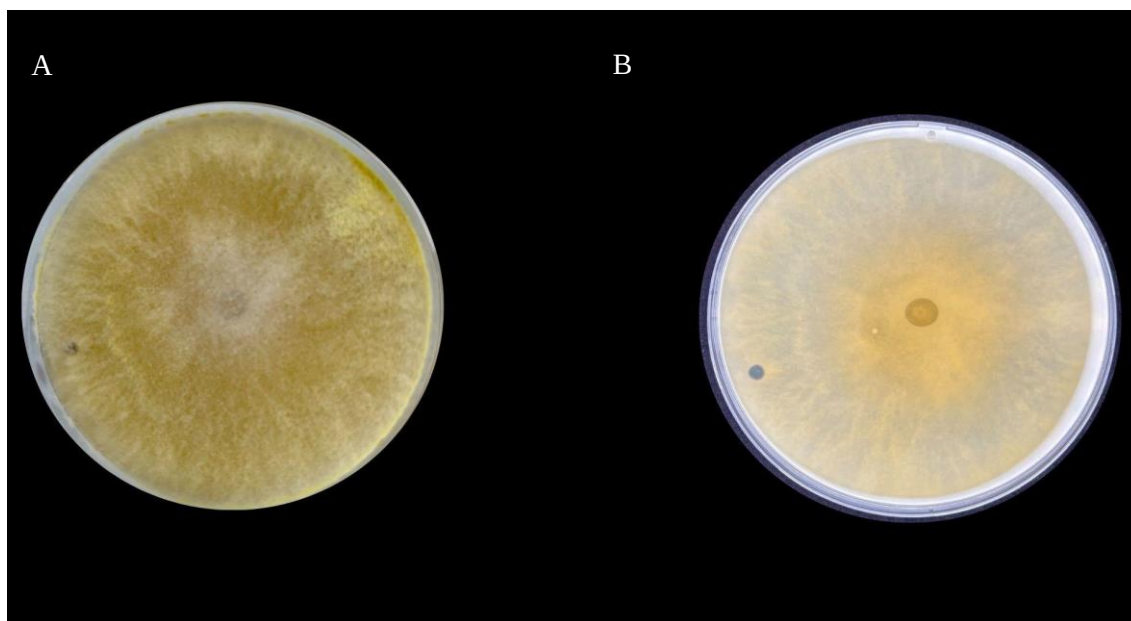


Figura 13: Cepa *T. afroharzianum* UEPAAAR12. Cepa cultivada en medio PDA durante 4 días a 28 °C. Sembrada a partir de un disco de 7mm tomado del extremo en crecimiento de una placa de Petri de *T. afroharzianum* UEPAAAR12 A: anverso; B: reverso).

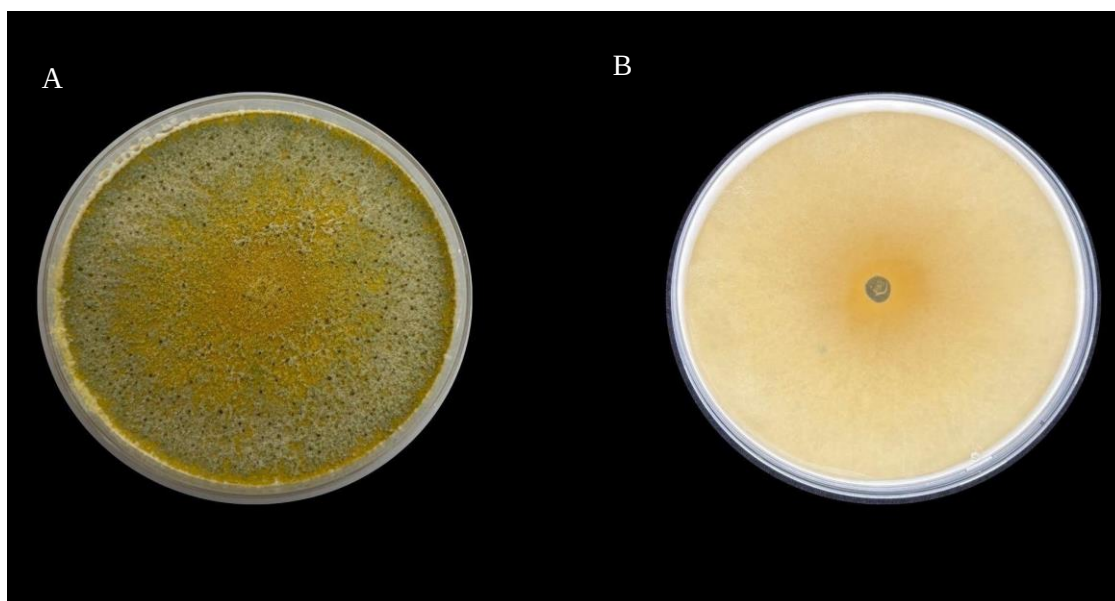


Figura 14: Cepa *T. afroharzianum* J50. Cepa cultivada en medio PDA 4 días a 28°C. Sembrada a partir de un disco de 7mm tomado del extremo en crecimiento de una placa de Petri de *T. afroharzianum* J50 durante (A: anverso; B: reverso).

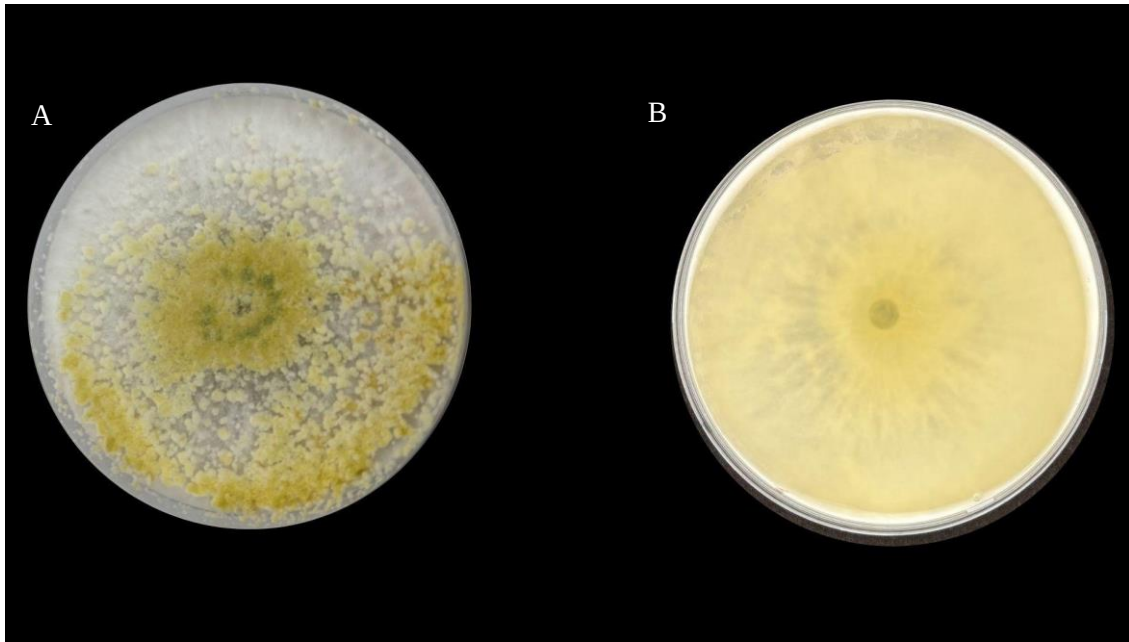


Figura 15: Ceba *Trichoderma spp* Pista 9. Ceba cultivada en medio PDA 4 días a 28°C. Sembrada a partir de un disco de 7mm tomado del extremo en crecimiento de una placa de Petri de *Trichoderma spp* Pista 9 (A: anverso; B: reverso).

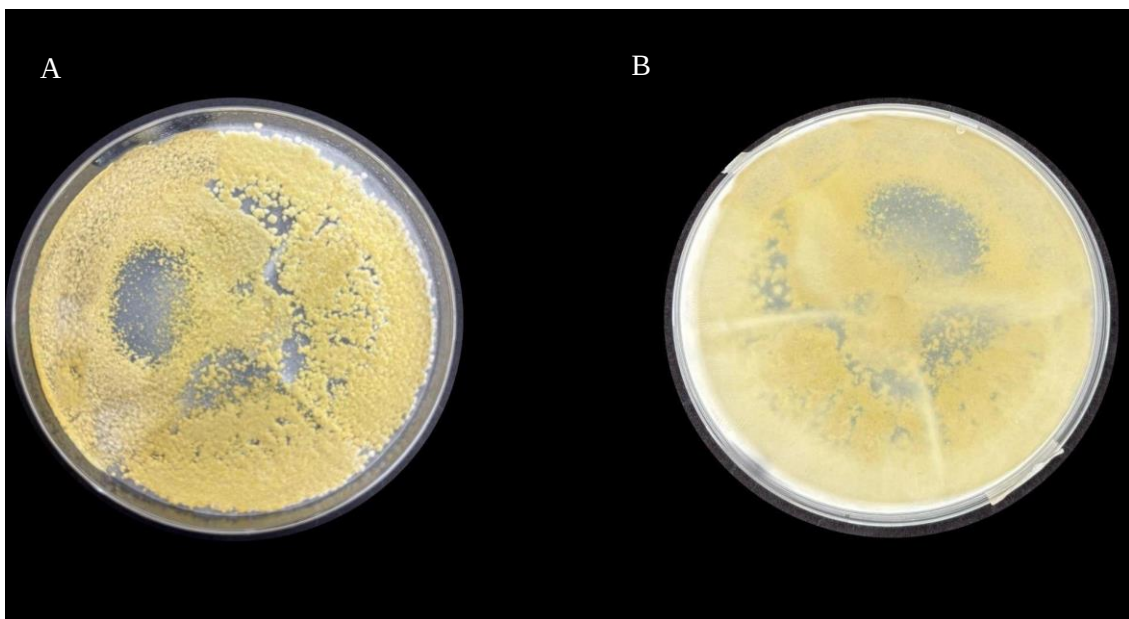


Figura 16: Ceba *T. afroharziaum* 3A3. Ceba cultivada en medio PDA durante 4 días a 28°C. Sembrada a partir de un disco de 7mm tomado del extremo en crecimiento de una placa de Petri de *T. afroharziaum* 3A3 (A: anverso; B: reverso).

Tabla 2: Caracterización macroscópica. A partir de las cepas sembradas en placa de Petri con medio PDA a 28 C° durante 3 días, se tomó un disco de 7 mm del extremo en crecimiento de las mismas y se sembró cada una en el centro de ocho placas de Petri y fueron cultivadas durante 4 días a 28 °C, se clasificó a cada una según, elevación, forma, margen, superficie y pigmentación anversa y reversa.

Características	Elevación	Forma	Margen	Superficie	Color anverso	Color reverso.
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR5 (Figura 9)	Elevada y limitada	Irregular	Ondulado	Sectorizada	Amarillo anaranjado.	Amarillo y blanco.
<i>Trichoderma</i> spp 20NAR3 (Figura 10)	Convexa umbilicada	Rizoidal.	Desflechado.	Surcos radiales.	Tonalidades amarillas	Tonalidades amarillas
<i>T. afroharzianum</i> 10BR1 (Figura 11)	Convexa umbilicada	Circular	Entero	Plegada	Blanco, amarillo y naranja	Naranja en el centro de la placa que se difuminó hacia los extremos en blanco
<i>T. afroharizanium</i> J66. (Figura 12)	Elevada y limitada pigmento anverso	Circular	Ondulado	Surcos radiales	Amarillo verdoso con surcos blancos, y reverso	Marrón en el centro de la placa con distintas tonalidades de naranja.
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR12 (Figura 13)	Elevada y limitada	Rizoide	Desflechado	Surcos radiales	Amarillo con filamentos blancos.	Amarillo central que se torna blanco hacia los límites de la placa.
<i>T. afroharzianum</i> J50 (Figura 14)	Elevada y limitada	Irregular	Liso	Plegada	Amarillo verdoso y en la circunferencia cercana a los límites	Blanco y naranja.

					de la placa reveló tonalidades verdes con puntuaciones violetas.	
<i>Trichoderma</i> <i>spp</i> Pista 9 (Figura 15)	Elevada y limitada	Irregular	Lobulado	Cerebriformes	Central verde y amarillo, hacia los bordes de la placa se observan tonalidades amarillas y blancas.	Amarillo
<i>Cepa</i> T. <i>afroharzianum</i> 3A3 (Figura 16)	Elevada y limitada	Irregular	Ondulado	Sectorizada	Amarillo.	Amarillo.

Al sembrar las cepas durante 4 días las mismas no presentaron esporulación, ni producción de metabolitos secundarios, esto se puede observar en la falta de coloración verde característica del género *Trichoderma*.

6.3.2 Características microscópicas

Se realizó una tinción con azul de metanol 1% p/v de forma de poder observar las características microscópicas de las distintas cepas de *Trichoderma* y poder describirlas en base a conidios, esporas, y micelios además de poder comparar sus similitudes y diferencias. Las características microscópicas se evaluaron mediante microcultivos preparados en agar Lactimel utilizando la técnica de Riddell (Riddell, 1950). Las observaciones se realizaron mediante un microscopio de campo claro con objetivos de 10× y 40×, con el fin de analizar los detalles estructurales del hongo.

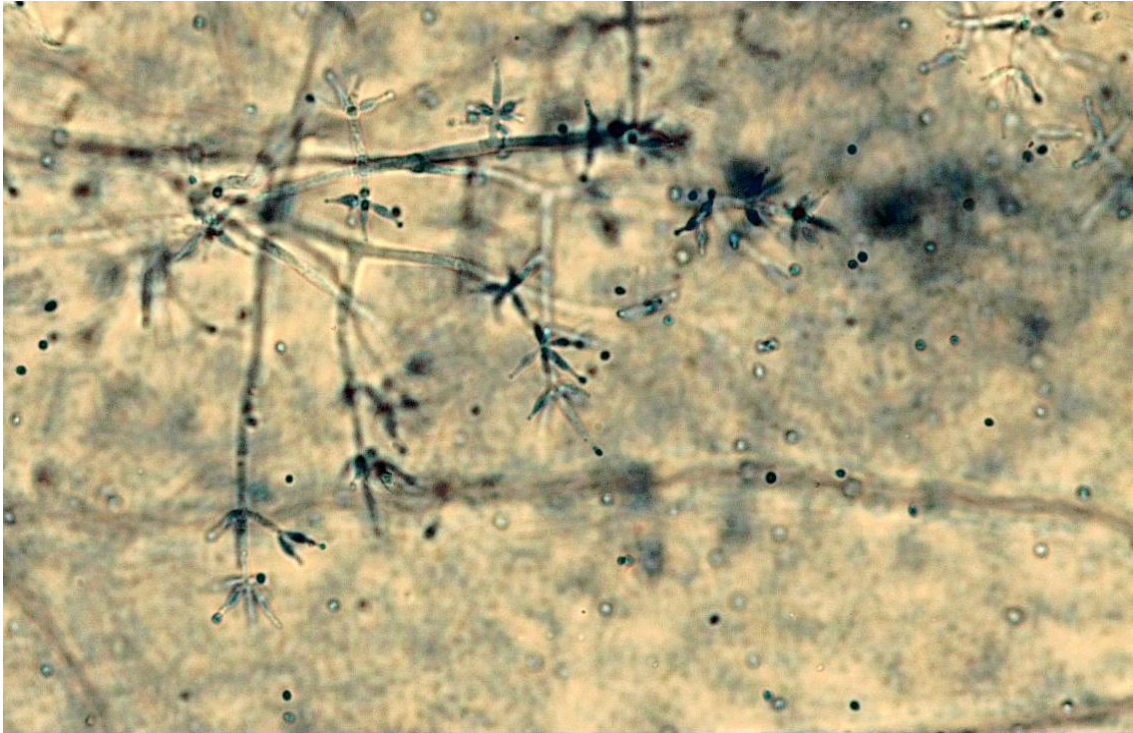


Figura 17: Imagen de esporas y micelio de *T. afroharzianum* UEPAAR 5. Obtenidas en microscopio óptico (40X), tinción azul de metileno 1% p/v y con técnica de Riddell.

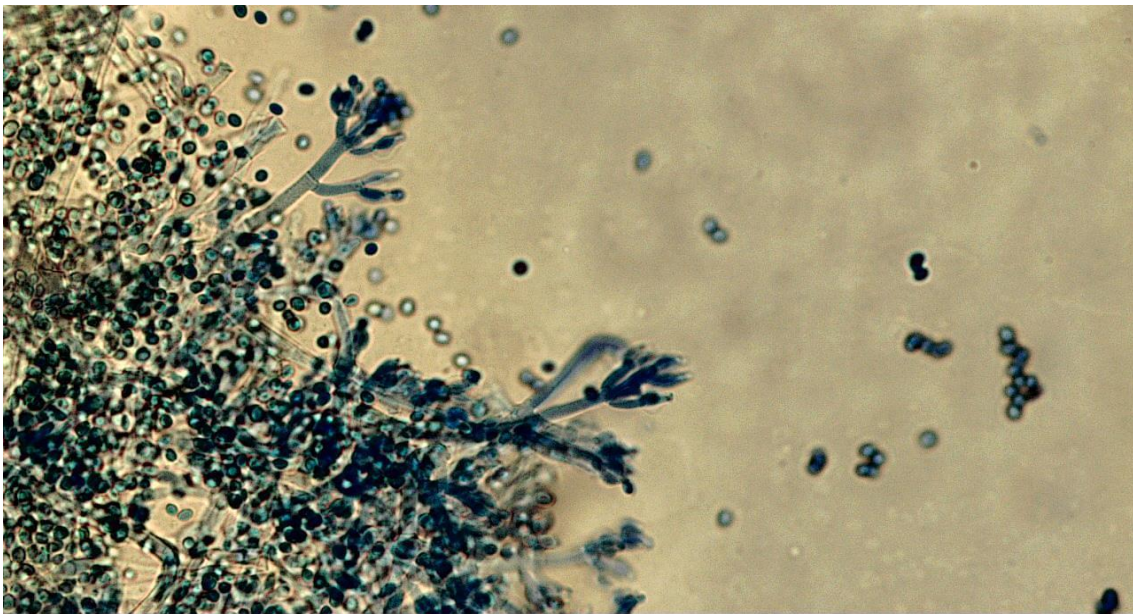


Figura 18: Imagen de esporas y micelio de *Trichoderma* spp 20NAR3. Obtenidas en microscopio óptico (40X), tinción con azul de metileno 1% p/v y con técnica de Riddell.

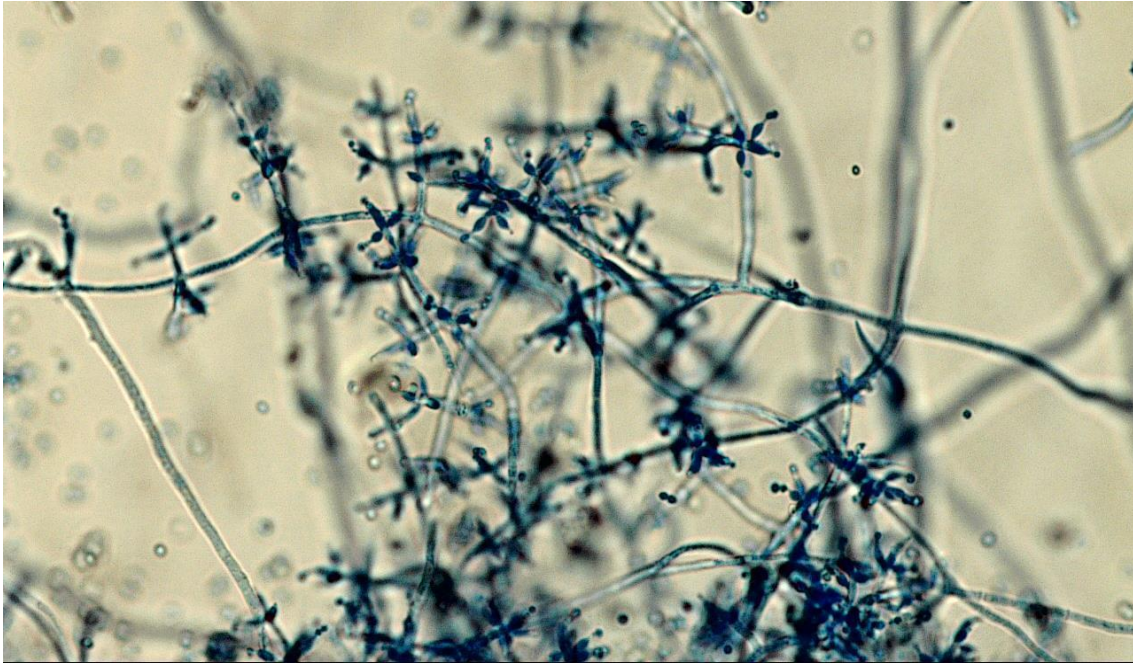


Figura 19: Imagen de esporas y micelio de *T. afroharzianum* 10BR1. Obtenidas en microscopio óptico (40X), tinción con azul de metileno 1% p/v y técnica de Riddell.

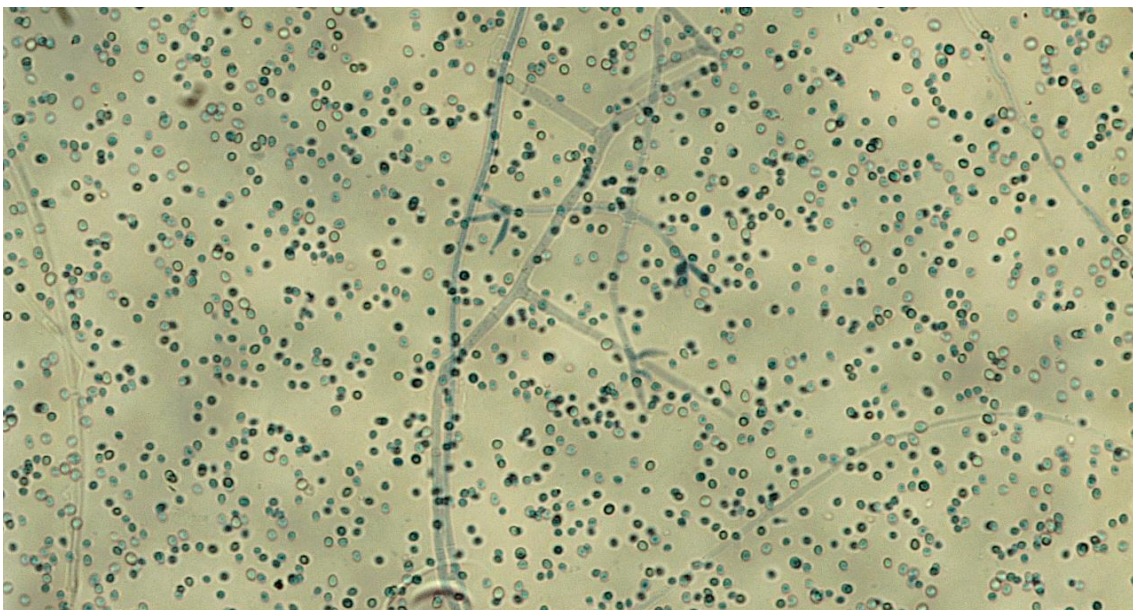


Figura 20: Imagen de esporas y micelio de *T. afroharzianum* J66. Obtenidas en microscopio óptico (40X), tinción azul de metileno 1% p/v y técnica de Riddell.



Figura 21: Imagen de esporas y micelio de *T. afroharzianum* UEPA AR12. Obtenidas en microscopio óptico (40X), tinción azul de metileno 1% p/v y técnica de Riddell.

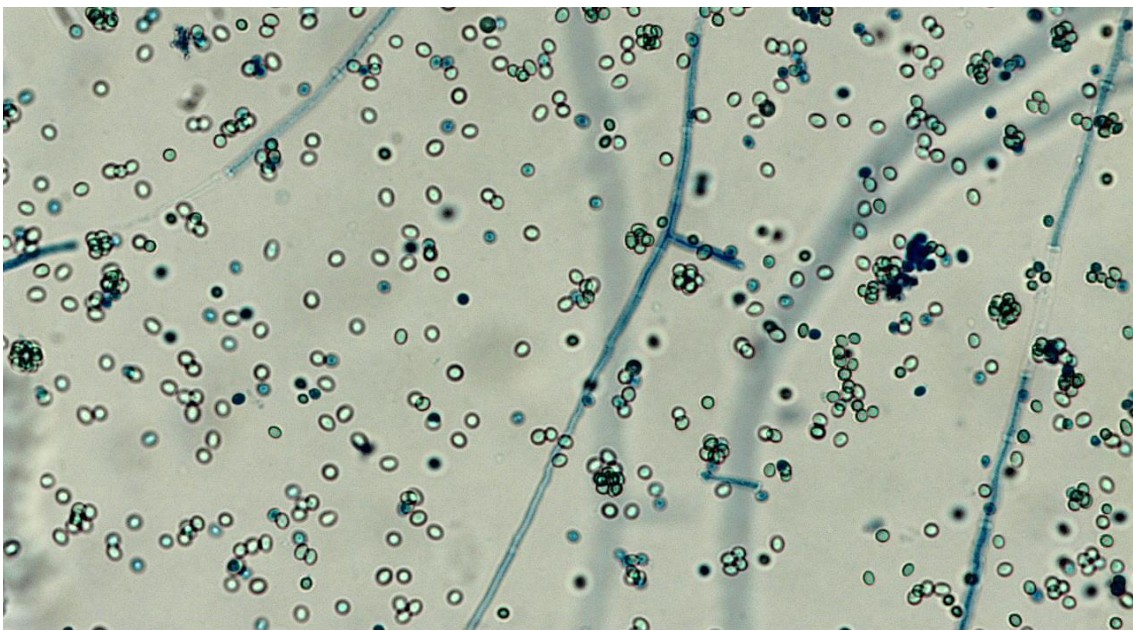


Figura 22: Imagen de esporas y micelio de *T. afroharzianum* J50. Obtenidas en microscopio óptico (40X), tinción de azul de metileno 1% p/v y técnica de Riddell.



Figura 23: Imagen de esporas y micelio de *Trichoderma* spp *Pista 9*. Obtenidas en microscopio óptico (40X), tinción azul de metileno 1% p/v y técnica de Riddell.



Figura 24: Imagen de esporas y micelio de *T. afroharzianum* 3A3. Obtenidas en microscopio óptico (40X), tinción de azul de metileno 1% p/v y técnica de Riddell.

El análisis de los aislamientos reveló una notable homogeneidad en sus caracteres diagnósticos primarios, compartiendo todas las cepas un micelio tabicado y una conidiogénesis enteroblástica a partir de fiálides diferenciadas, lo que confirma la estabilidad del género bajo las condiciones de cultivo y tinción empleadas. No obstante, se manifiestan variaciones fenotípicas significativas en la arquitectura del aparato

reproductor, donde cepas como *T. afroharzianum* J66 (Figura 20) y *T. afroharizanium* J50 (Figura 22) presentan una esporulación masiva y dispersa que contrasta con la organización más localizada y ramificada de *T. afroharzianum* UEPAAR12 (Figura 21). Asimismo, la disposición de los penachos fialídicos varía desde agrupaciones verticiladas densas en *Trichoderma spp* 20NAR3 (Figura 18) y *T. afroharzianum* 3A3 (Figura 24), que forman cabezuelas apicales bien definidas, hasta tramas miceliales más abiertas en *T. afroharzianum* 10BR1 (Figura 19) o aglomeraciones compactas en *Trichoderma spp* Pista 9 (Figura 23) que dificultan la individualización de las fiálides. Estas divergencias en la densidad de propágulos y en la estructuración de los conidióforos sugieren capacidades diferenciales de colonización entre las cepas aisladas.

6.4. Enfrentamientos *in vitro*

Se realizaron enfrentamientos *in vitro* entre las ocho cepas de *Trichoderma* presentadas y los tres fitopatógenos. Estos ensayos realizados sirvieron para analizar, como varió las características macroscópicas de los patógenos, como de las cepas en estudio en presencia de su antagonista. También se utilizaron estos enfrentamientos para el estudio de la velocidad de crecimiento que presentan cada uno, tanto individualmente como en presencia de ambos. Por último, se observó que se generan halos de inhibición en la zona de contacto entre los patógenos y las cepas de *Trichoderma*, este fue utilizado para el estudio de metabolitos secundarios que serían los responsables del poder biocontrolador por parte de *Trichoderma*.

En cada control como en los enfrentamientos se sembró un disco de 7mm de PDA proveniente del crecimiento activo de los correspondientes microorganismos.

6.4.1. Controles de patógenos

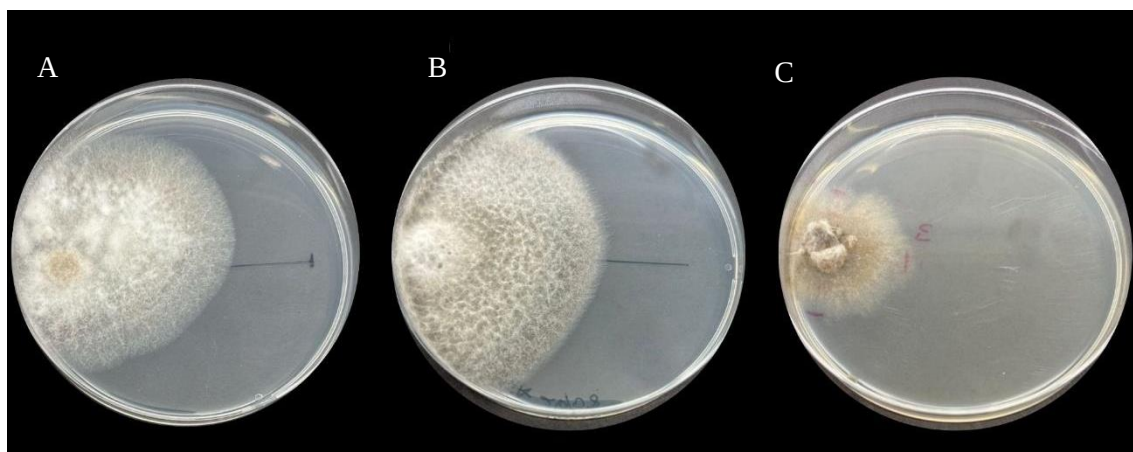


Figura 25: Control de fitopatógenos. Se realizó la extracción de discos de 7 mm a partir del crecimiento activo de placas de Petri conteniendo cada patógeno, las cuales fueron sembradas en medio PDA y cultivadas en cámara a 28°C. Y se sembró ese disco en el extremo izquierdo de placas nuevas de PDA, se cultivó cada una el tiempo siguiente a 28°C. A) Control *F. oxysporum* (6 días). B) Control *A. alternata* (6 días). C) Control *B. cinerea*. (3 días).

El patógeno *B. cinerea* fue el primero analizado y se cultivó 3 días en cámara a 28°C, se observó que el tiempo no fue suficiente, ya que debido a su crecimiento lento no pudo presentar competencia a las cepas de *Trichoderma*, de allí se decidió que los patógenos *F. oxysporum* y *A. alternata* se los cultivó durante 6 días, 3 días previos a la siembra de las cepas de *Trichoderma* y los 3 días siguientes en los que se realizaron las medidas y observaciones.

6.4.2. Cepas de *Trichoderma* spp.

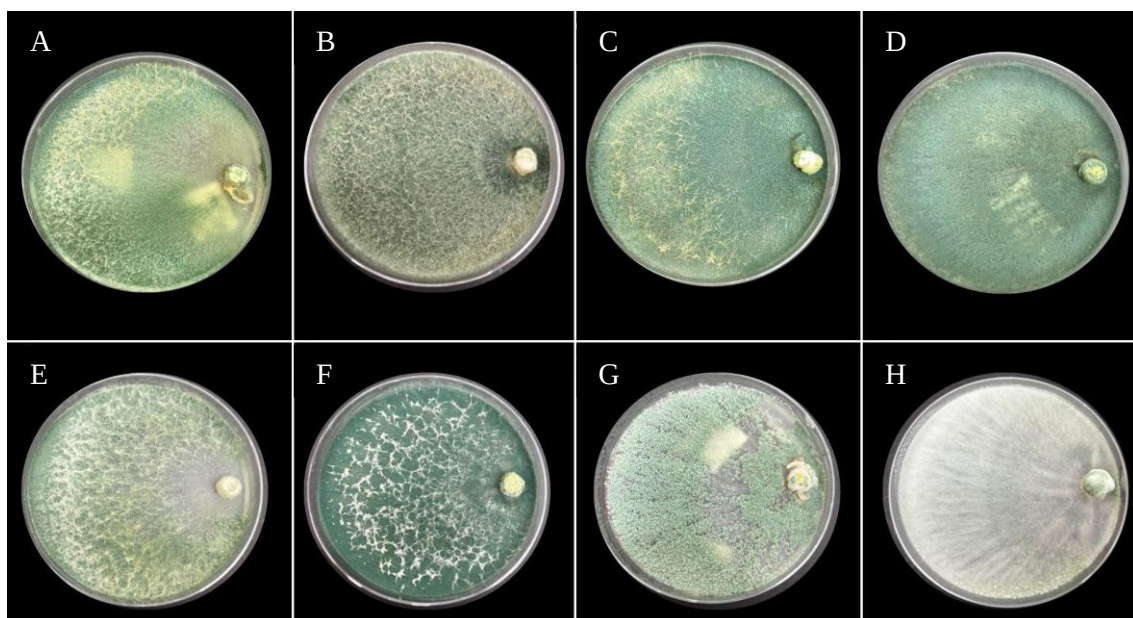


Figura 26: Controles positivos cepas de *Trichoderma*. Crecidas en medio APD a 28°C durante 6 días. A) *T. afroharzianum* UEPAAR5. B) *Trichoderma* spp 20NAR3. C) *T. afroharzianum* 10BR1. D) *T. afroharzianum* J66. E) *T. afroharzianum* UEPAAR12 F) *T. afroharzianum* J50. G) *Trichoderma* spp Pista 9. H) *T. afroharzianum* 3A3.

A partir de las características macroscópicas de la Figura 26 se pueden observar que las cepas presentaron una coloración verde característica del género *Trichoderma*, esto podría deberse al mayor tiempo de cultivo que presentan estas cepas en comparación con las presentadas en el apartado 6.1.2, esta diferencia temporal permitiría a las cepas alcanzar el estado de esporulación y generar este color característico.

6.4.3. Enfrentamientos *in vitro* de *Trichoderma* spp vs. *B. cinerea*.

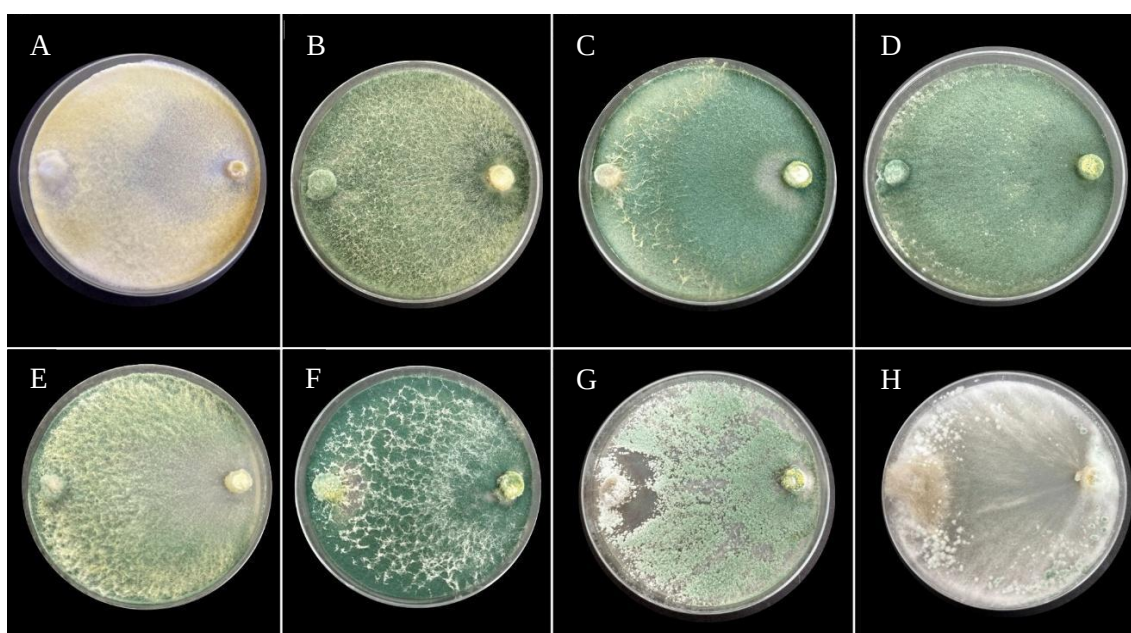


Figura 27: Enfrentamientos duales *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma* contra *B. cinerea*. Crecidas en medio APD a 28°C durante 6 días. A) *T. afroharzianum* UEPAAR5. B) *Trichoderma* spp 20NAR3. C) *T. afroharzianum* 10BR1. D) *T. afroharzianum* J66. E) *T. afroharzianum* UEPAAR12 F) *T. afroharzianum* J50. G) *Trichoderma* spp Pista 9. H) *T. afroharzianum* 3A3.

La evaluación de los enfrentamientos *in vitro* (Figura 27) evidenció la capacidad antagonista de las distintas cepas de *Trichoderma* frente a los fitopatógenos ensayados. En el caso de *B. cinerea*, el patógeno fue completamente micoparasitado por *Trichoderma* en todas las cepas evaluadas. Asimismo, se puede observar un cambio en la coloración por parte de las cepas de *Trichoderma*, específicamente por parte de *T. afroharzianum* UEPAAR 5, esto podría deberse a la producción de metabolitos secundarios generados ante el censo del patógeno. (Figura 27 A).

6.4.4. Enfrentamientos *in vitro* de *Trichoderma* spp vs *A. alternata*.

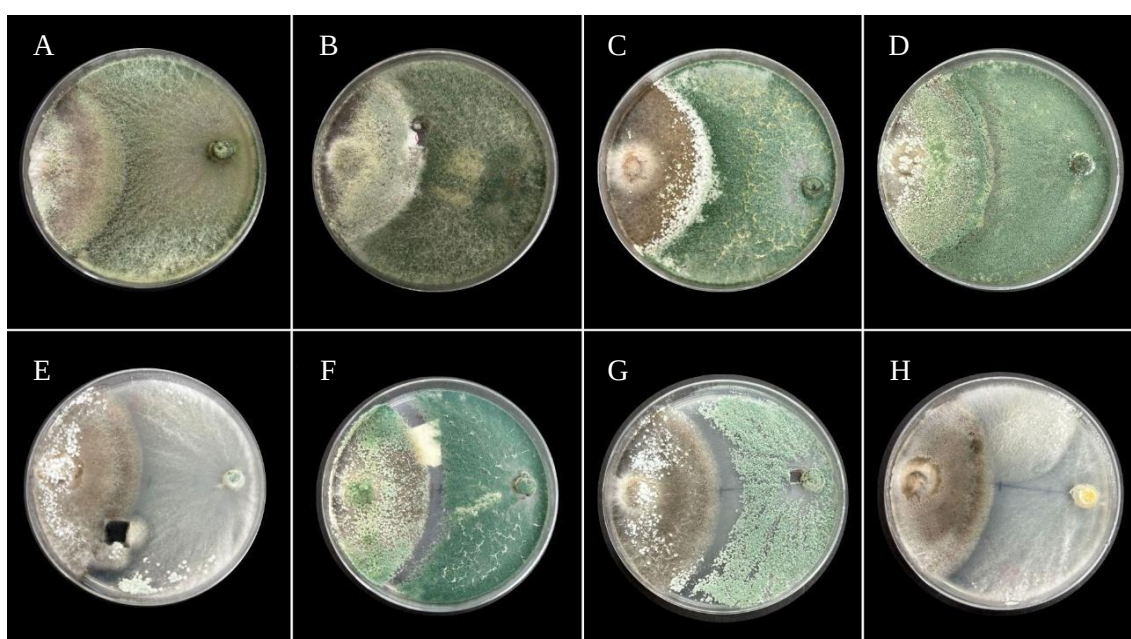


Figura 28: Enfrentamientos duales *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma* contra *A. alternata*. Crecidas en medio APD a 28°C durante 6 días. A) *T. afroharzianum* UEPAAR5. B) *Trichoderma* spp 20NAR3. C) *T. afroharzianum* 10BR1. D) *T. afroharzianum* J66. E) *T. afroharzianum* UEPAAR12 F) *T. afroharzianum* J50. G) *Trichoderma* spp Pista 9. H) *T. afroharzianum* 3A3.

En los ensayos de enfrentamientos duales con *A. alternata*, este fue sobrepasado por *Trichoderma* en todos los casos (Figura 28). La producción de metabolitos secundarios y esporulación se manifestó mediante cambios de coloración en las cepas, *T. afroharzianum* UEPAAR5(A), *T. afroharzianum* UEPAAR 12(E), así como por la presencia de halos de inhibición en la zona de contacto con el patógeno en las cepas *T. afroharzianum* J50 (F), *Trichoderma* spp Pista 9 (G) y *T. afroharzianum* 3A3 (H).

6.4.5. Enfrentamientos *in vitro* de *Trichoderma* spp. vs *F. oxysporum*.

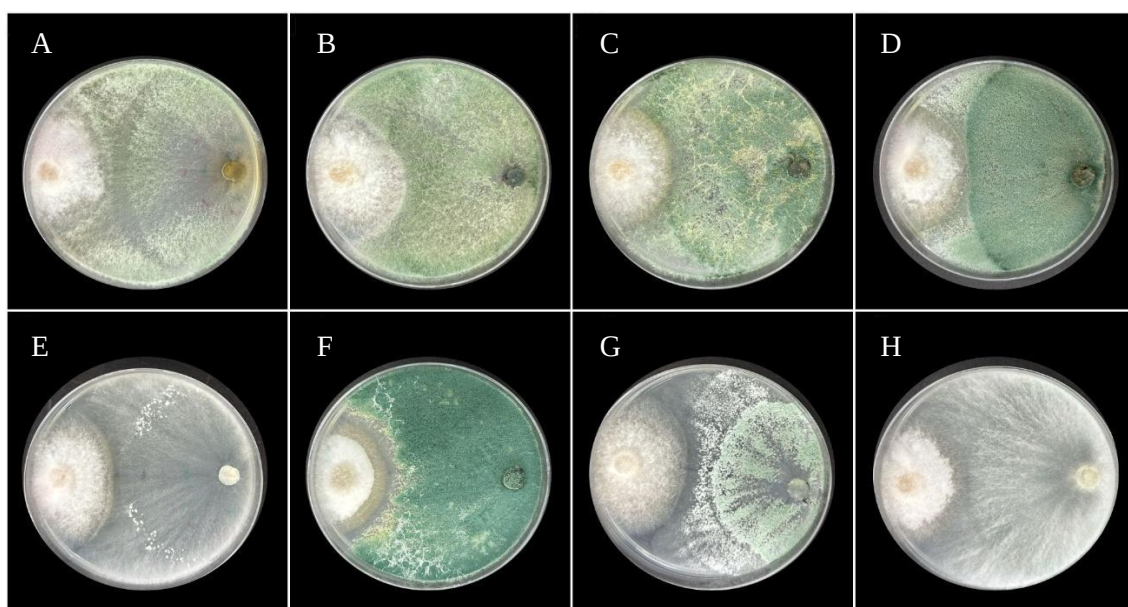


Figura 29: Enfrentamientos duales *in vitro* de diferentes cepas de *Trichoderma* contra *F. oxysporum*. Crecidas en medio APD a 28°C durante 6 días A A) *T. afroharzianum* UEPAAR5. B) *Trichoderma* spp 20NAR3. C) *T. afroharzianum* 10BR1. D) *T. afroharzianum* J66. E) *T. afroharzianum* UEPAAR12 F) *T. afroharzianum* J50. G) *Trichoderma* spp Pista 9. H) *T. afroharzianum* 3A3.

En el enfrentamiento con *F. oxysporum*, se observó la formación de halos de inhibición marcados en el área de contacto, asociados a la producción de metabolitos secundarios, junto con cambios de coloración en las cepas *T. afroharzianum* UEPA AR5 (A), *Trichoderma* spp 20NAR3 (B), *T. afroharzianum* 10BR1 (C) y *T. afroharzianum* UEPA AR12(E) (Figura 29).

En base a las figuras 27, 28 y 29 se realizó la categorización de las cepas de *Trichoderma* en función del micoparasitismo observado mediante enfrentamientos

duales en placa, lo que permitió evaluar comparativamente su capacidad antagonista frente a los distintos fitopatógenos ensayados.

Se clasificó a las distintas cepas de *Trichoderma* en diferentes categorías a partir de su capacidad de micoparasitismo y de avance sobre el patógeno enfrentado. Las categorías se clasifican de acuerdo a la zona que logra invadir cada uno de los hongos enfrentados:

Clase 1, *Trichoderma* ocupa el 100% de la placa, sobrepasando al patógeno.

Clase 2, *Trichoderma* ocupa el 75% de la placa, sin sobrepasar al patógeno.

Clase 3, *Trichoderma* ocupa el 50% de la placa.

Clase 4: *Trichoderma* ocupa el 25% de la placa.

Clase 5, el patógeno ocupa el 100% de la placa, sobrepasando a *Trichoderma* (Santone, 2024).

Tabla 3: Categorías aplicadas a cada cepa de *Trichoderma* en base al micoparasitismo observado ante los distintos patógenos. En base al grado de avance que presentó cada cepa de *Trichoderma* frente al patógeno evaluado, se las clasificó en clases 1 a 5. Tanto las cepas de *Trichoderma* como los patógenos utilizados, fueron aislados a partir del extremo en crecimiento de placas de Petri en medio PDA cultivadas a 28°C. Se tomó un disco de 7mm y se sembró cada disco a 7 cm de distancia entre sí en placas de Petri con medio PDA en cámara a 28°C.

	<i>B.cinerea.</i>	<i>F.oxysporum.</i>	<i>A.alternata.</i>
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR 5	clase 1	clase 2	clase 1
<i>Trichoderma spp</i> 20NAR3	clase 1	clase 2	clase 1
<i>T. afroharzianum</i> 10BR1	clase 1	clase 1	clase 1
<i>T. afroharzianum</i> J66	clase 1	clase 2	clase 1
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR 12	clase 1	clase 1	clase 1
<i>T. afroharzianum</i> J50	clase 1	clase 1	clase 1
<i>Trichoderma spp</i> Pista 9	clase 1	clase 2	clase 1
<i>T. afroharzianum</i> 3A3	clase 1	clase 1	clase 1

Frente a *B. cinerea*, todas las cepas evaluadas fueron clasificadas como Clase 1, lo que indica que *Trichoderma* ocupó el 100% de la placa y sobrepasó completamente al patógeno. En los enfrentamientos con *A. alternata* se observó un comportamiento similar, todas las cepas fueron categorizadas como Clase 1, evidenciando un completo sobrecrecimiento de *Trichoderma* sobre el patógeno.

En contraste, los resultados frente a *F. oxysporum* mostraron una mayor variabilidad entre las cepas. Las cepas *T. afroharzianum* 10BR1, *T. afroharzianum* UEPA AR 12, *T. afroharzianum* J50 y *T. afroharzianum* 3A3 fueron clasificadas como Clase 1, indicando un sobrepaso total del patógeno por parte de *Trichoderma*. Por su parte, las cepas *T. afroharzianum* UEPA AR5, *Trichoderma spp* 20NAR3, *T. afroharzianum* J66 y *Trichoderma spp* Pista 9 fueron categorizadas como Clase 2, ocupando aproximadamente el 75 % de la placa.

Esta etapa permitió identificar las cepas de *Trichoderma* con mayor capacidad inhibitoria frente a los patógenos seleccionados.

En conjunto, estos resultados indican que todas las cepas de *Trichoderma* evaluadas presentaron una elevada capacidad antagonista frente a *B. cinerea* y *A. alternata*, mientras que frente a *F. oxysporum* se observaron diferencias en el grado de micoparasitismo entre las cepas analizadas. De igual forma todas presentaron inhibición del crecimiento del patógeno analizado.

6.4.6. Evaluación cinética de crecimiento

En base al ensayo de enfrentamientos realizado y la clasificación de micoparasitismo observado se decidió realizar mediciones del crecimiento radial promedio, tanto de los controles como de los enfrentamientos, y se estudió cómo variaron las velocidades de crecimiento del radio promedio de los patógenos y de *Trichoderma* en ausencia y presencia del antagonista.

6.4.6.1. Evaluación cinética de crecimiento cepas de *Trichoderma*

Ocho discos de 7mm de cada cepa de *Trichoderma* fueron sembradas en un extremo de una Placa de Petri conteniendo PDA y se las cultivó en cámara a 28°C durante tres días. Se realizaron mediciones diarias, tanto centrales como laterales, a partir del centro del disco cultivado hasta el crecimiento activo de la cepa, y se calculó, a partir de las 3 mediciones, un promedio del avance del radio para ese día analizado.

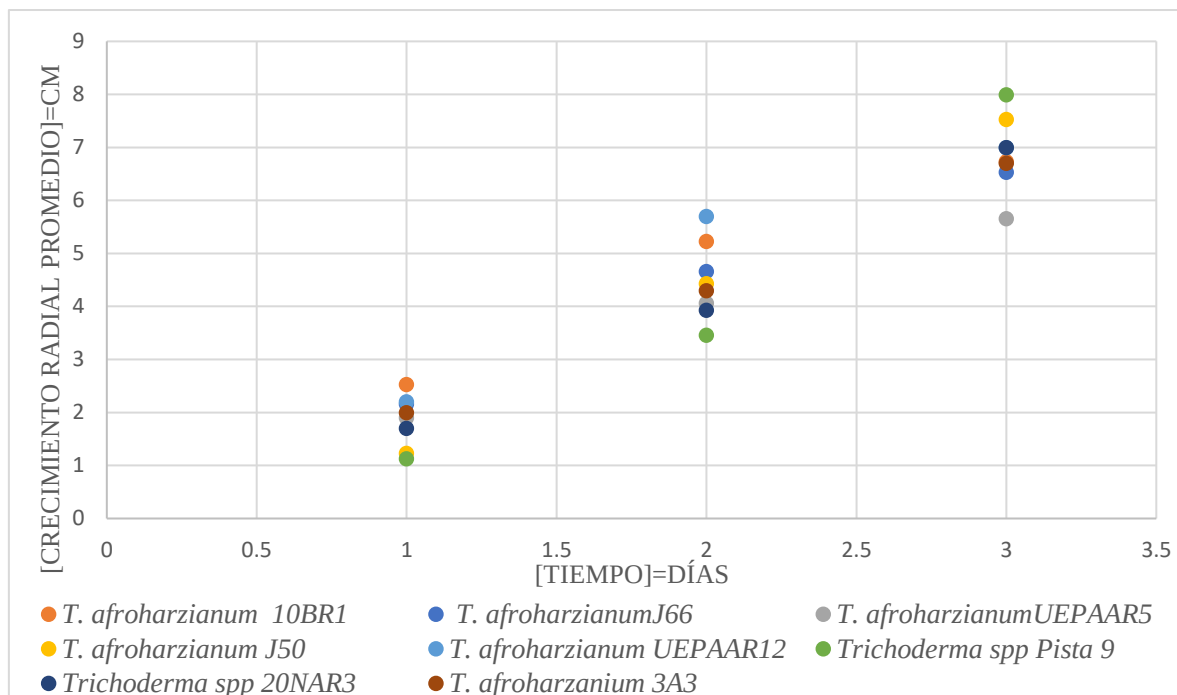


Figura 30: Crecimiento radial promedio cepas de *Trichoderma*. Se realizó la medición radial del crecimiento de cada cepa de *Trichoderma*, tomando por día su crecimiento desde el centro del disco de 7 mm sembrado, considerando el extremo limitante el borde de crecimiento activo de la cepa, se midió hacia el centro de la placa y los laterales, se los promedió y se lo colocó como medida de crecimiento radial promedio.

Tabla 4: Valores obtenidos de las medidas de crecimiento radial promedio para cepas de *Trichoderma*. Se realizó la tabla pertinente a los valores observados en la figura 30. Se puede observar los centímetros radiales promedios avanzados por *Trichoderma* medidos durante los 3 días, como también la regresión lineal, a partir de la pendiente de la misma se compararon velocidades de crecimiento radial promedio entre cada cepa y luego entre la cepa y el enfrentamiento contra cada patógeno.

[Tiempo]=Días.	[Crecimiento radial promedio]=cm.							
	<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR5	<i>Trichoderma</i> spp 20NAR3	<i>T. afroharzianum</i> 10BR1	<i>T. afroharzianum</i> J66	<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR12	<i>T. afroharzianum</i> J50	<i>Trichoderma</i> spp Pista 9	<i>T. afroharzianum</i> 3A3
1	1,90	1,70	2,53	2,16	2,20	1,23	1,13	2,00
2	4,06	3,93	5,23	4,66	5,70	3,20	2,33	4,30
3	5,66	7,00	6,73	6,53	7,00	3,13	5,53	6,70
Regresión lineal.[crecimiento radial promedio]=m.[tiempo]+h								
	m=1,88cm/día h=0,1133cm	m=2,65cm/día h=1,09cm	m=2,10cm/día h=0,63cm	m=2,18cm/día h=0,08cm	m=2,40cm/día h=0,01cm	m=3,15cm/día h=1,90cm	m=3,43cm/día h=2,66cm	m=2,35cm/día h=0,36cm

Se puede observar que las cepas de *Trichoderma* analizadas presentan una velocidad de crecimiento radial promedio variable, la cepa que mayor velocidad de

crecimiento radial promedio presentó fue *Trichoderma spp* Pista 9 y la menor, *T. afroharzianum* UEPAAR5.

6.4.6.2. Evaluación cinética de crecimiento de patógenos

Se repitió el análisis para los fitopatógenos y se midió su crecimiento radial promedio durante 3 días. El mismo consistió en medir a partir del centro disco de 7 mm sembrado hacia el centro y los laterales tomando como limite el crecimiento activo del patógeno.

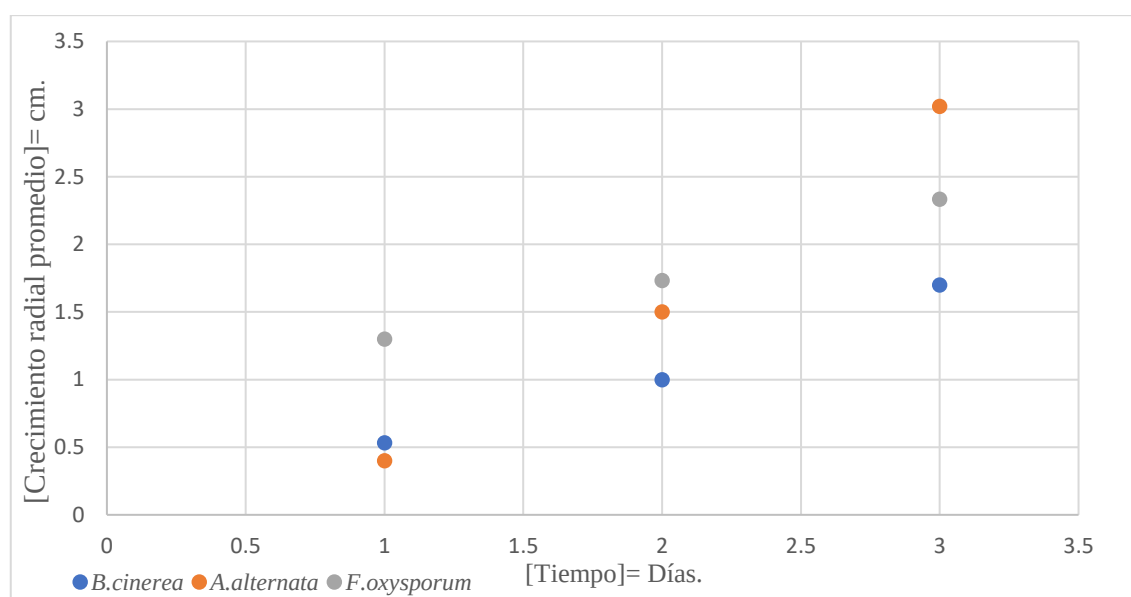


Figura 31: Crecimiento radial promedio *A. alternata*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*. Se realizó la medición radial promedio del crecimiento de cada patógeno, tomando por día su crecimiento desde el centro del disco de 7 mm sembrado, considerando el extremo limitante el borde de crecimiento activo de la cepa, se midió hacia el centro de la placa y los laterales, se los promedió y se lo colocó como medida de crecimiento radial.

Tabla 5: Valores obtenidos de las medidas de crecimiento radial promedio para cepas patogénicas. Se confeccionó la tabla pertinente a los valores observados en la figura 31. Se puede observar los centímetros radiales promedios avanzados por cada patógeno, medidos durante 3 días, como también se realizó la regresión lineal, a partir de la pendiente de la misma se compararon velocidades de crecimiento radial promedio entre cada cepa y luego entre la cepa y el enfrentamiento contra cada patógeno

	[Crecimiento radial promedio]=cm.		
[Tiempo]=Días.	<i>F.oxysporum</i>	<i>A.alternata</i>	<i>B.cinerea</i>
1	1,30	0,40	0,53
2	1,73	1,50	1,0
3	2,33	3,02	1,70
Regresión lineal. [Crecimiento radial promedio]= m.[tiempo]+h			
	m= 0,51cm/día h=0,75cm	m=1,31cm/día h=-0,98cm	m= 0,58cm/día h=-0,08cm

A partir de las regresiones lineales se pudo observar cómo los patógenos presentan menores velocidades de crecimiento radial promedio en comparación con las cepas de *Trichoderma*, como también cómo varían estas velocidades entre patógenos. (Tabla 5).

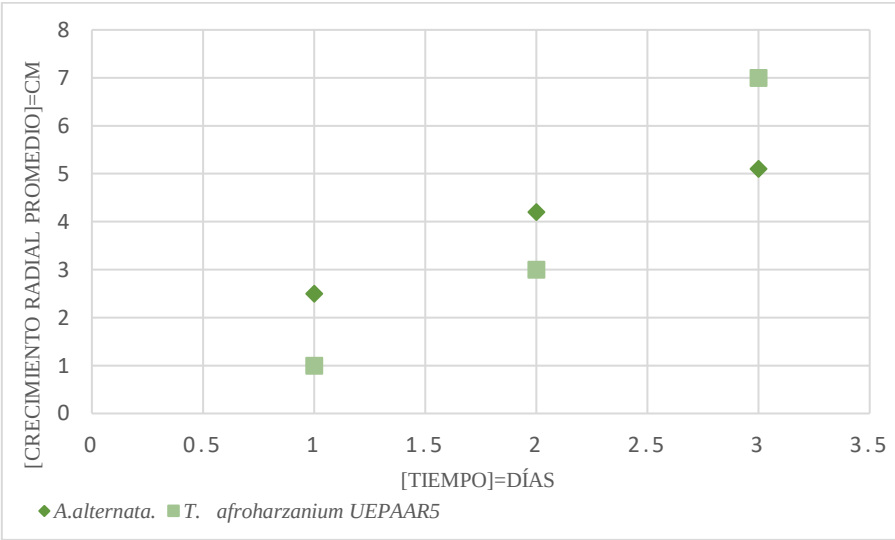
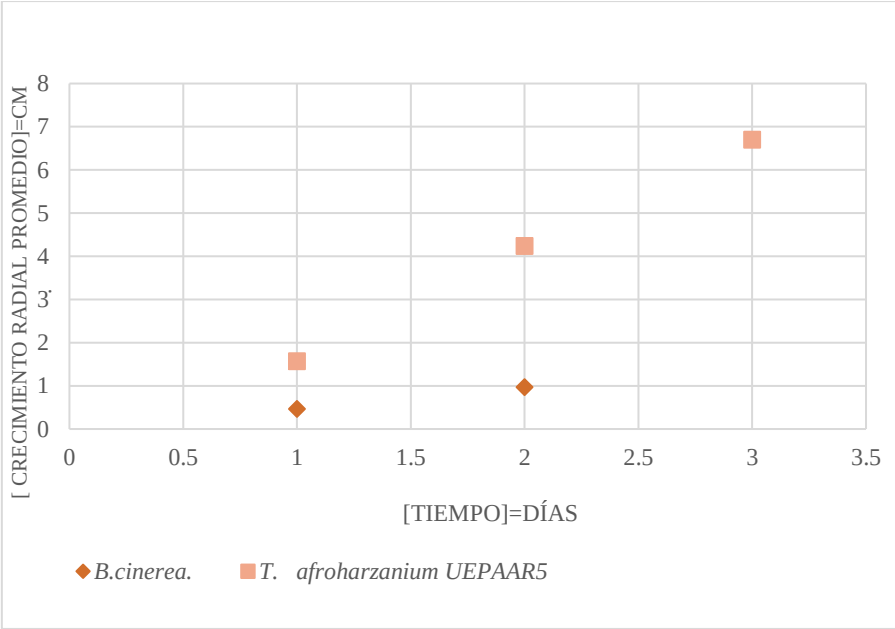
En estas mediciones se debe tener en cuenta que el patógeno *B. cinerea* fue medido durante los primeros tres días de crecimiento activo; para los demás patógenos se tomó como tiempo 0 el tercer día de crecimiento activo, el mismo día en que se sembraron las cepas de *Trichoderma* en los enfrentamientos. Esta decisión fue concebida a causa de la diferencia de velocidades entre los patógenos y las mismas.

6.4.6.3. Evaluación de cinética de crecimiento de los distintos enfrentamientos

Al realizar los enfrentamientos *in vitro* se midieron los centímetros que crecieron radialmente cada cepa y cada patógeno en el transcurso de 3 días para evaluar cómo varia el crecimiento del patógeno en presencia de cada cepa de *Trichoderma* y, con todos los resultados expuestos, poder definir qué cepas tienen mayor de inhibición frente a cada patógeno.

Debido a que los patógenos presentan crecimiento lento, se sembró a *A. alternata* y *F. oxysporum* 3 días antes en la misma placa que se realizó el enfrentamiento, de forma

que puedan presentar crecimiento y no ser totalmente micoparasitados por las cepas de *Trichoderma* que presentan crecimiento rápido. Esta metodología se aplicó luego de observar que al sembrar las cepas de *Trichoderma* al mismo tiempo que el patógeno *B. cinerea*, el mismo fue totalmente micoparasitado debido a su crecimiento más lento.



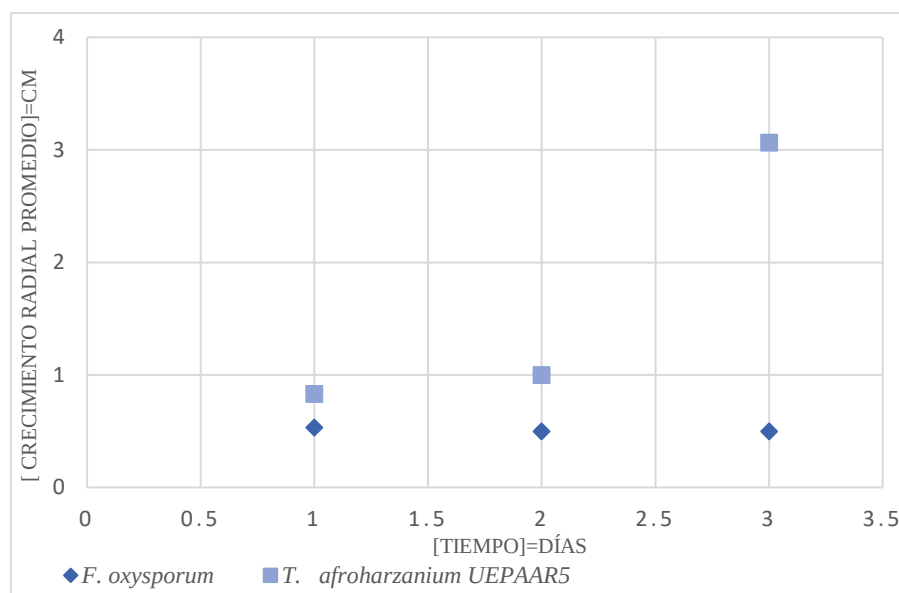


Figura 32. Cinética de crecimiento de la cepa *T. afroharzianum* UEPAAR5. Valores obtenidos de la medición durante 3 días de los centímetros avanzados radialmente por día, promediado los valores laterales con el central que fueron tomados a partir del centro del disco de 7mm sembrado. Frente a los patógenos *B. cinerea*, *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Tabla 6: Ecuaciones obtenidas de los enfrentamientos de *T. afroharzianum* UEPAAR5 frente a cada patógeno. Se realizó la regresión lineal de la figura 32, a partir de la pendiente de las misma se compararon velocidades de crecimiento radial promedio de la cepa en su enfrentamiento contra cada patógeno, cómo también como varían en comparación con los controles.

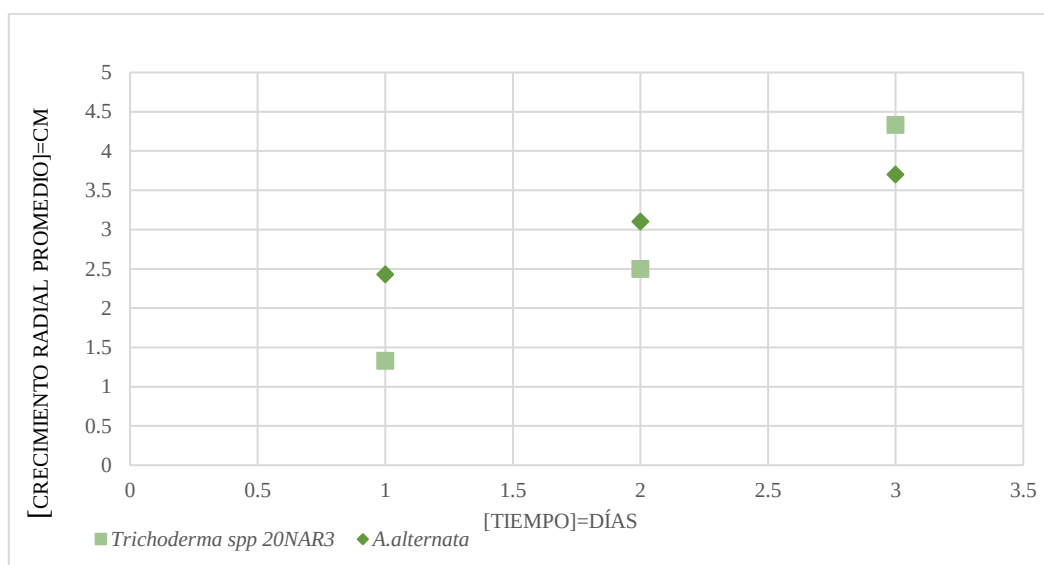
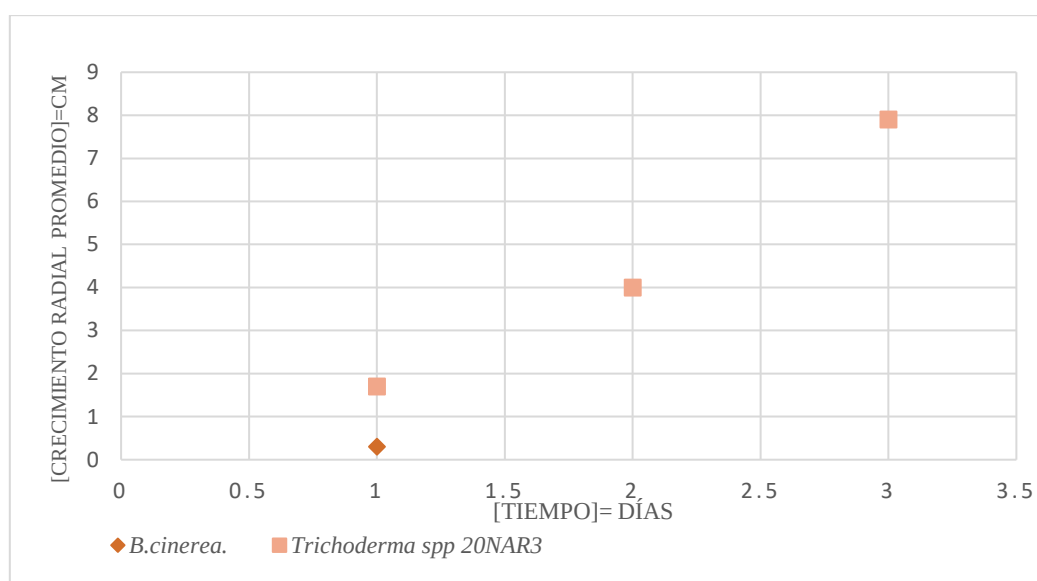
Regresión lineal. [crecimiento radial promedio]=m.[tiempo]+h			
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR5 frente a <i>B. cinerea</i>	m= 2,56cm/día h= -0,96cm	<i>B. cinerea</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> UEPAAR5	m= 0,5cm/día h=0,03cm
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR5 frente a <i>A. alternata</i>	m= 3,00cm/día h=-2,33cm	<i>A. alternata</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> UEPAAR5	m= 1,30cm/día h=-1,33cm
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR5 frente a <i>F. oxysporum</i>	m= 1,11cm/día h=-0,60cm	<i>F. oxysporum</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> UEPAAR5	m= 0,75cm/día h=0,13cm

A partir de los resultados obtenidos en las Figura 32, Tabla 4,5 y 6 se concluyó que la cepa de *T. afroharzianum* UEPAAR5 control, presentó una velocidad de crecimiento radial promedio de 1,18 cm/día mientras que en presencia de *F. oxysporum* se observó una velocidad de crecimiento radial promedio de 1.11 cm/día. Por otro lado, el patógeno

presentó un aumento en la velocidad de crecimiento radial promedio de 0,51 cm/día a 0.75 cm /día.

Por otro lado, se observó que la cepa de *Trichoderma* frente al patógeno *A. Alternata* aumentó su velocidad de crecimiento desde 1,18 cm/día a 3 cm/día y el patógeno mantuvo su velocidad de crecimiento aproximadamente constante en presencia como en ausencia de la cepa *T. afroharzianum* UEPAAR5 creciendo 1,31cm/día.

Por último, al comparar el control frente al enfrentamiento, para la cepa mencionada y *B. cinerea* se observó que el patógeno disminuyó su velocidad de crecimiento radial promedio en menos de la mitad, mientras que la cepa de *Trichoderma* aumentó su velocidad de crecimiento radial promedio a más del doble.



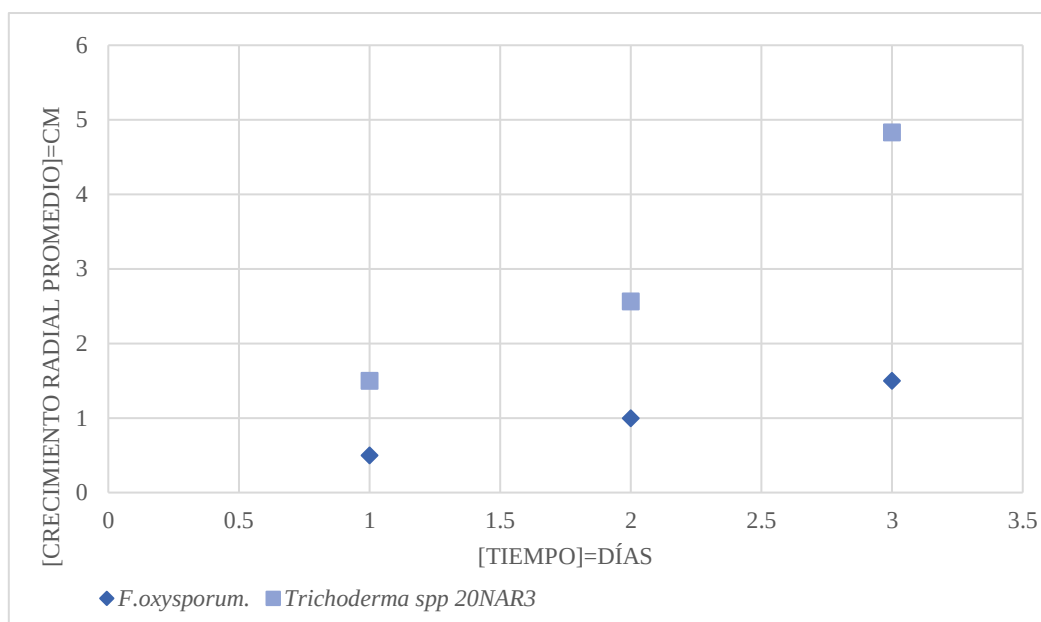


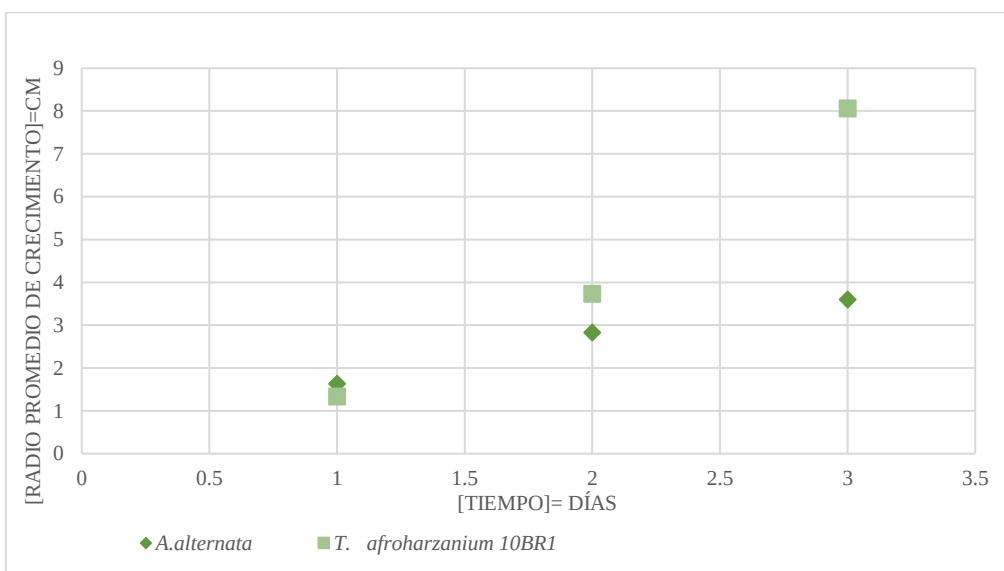
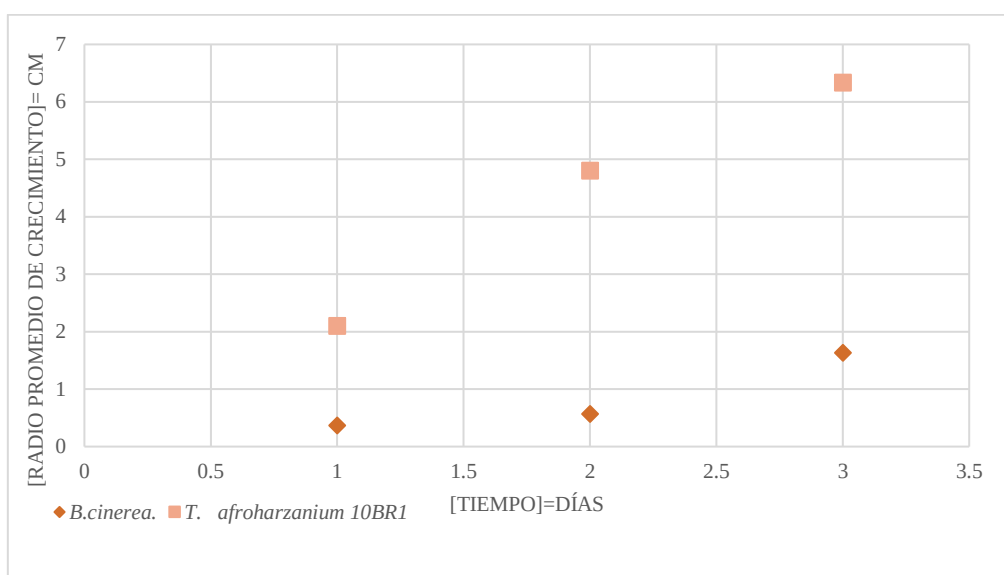
Figura 33: Cinética de crecimiento de la cepa *Trichoderma spp* 20NAR3. Valores obtenidos de la medición durante 3 días de los centímetros avanzados radialmente por día, promediado los valores laterales con el central que fueron tomados a partir del centro del disco de 7mm sembrado. Frente a los patógenos *B. cinerea*, *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Tabla 7: Ecuaciones obtenidas de los enfrentamientos de *Trichoderma spp* 20NAR3 frente a cada patógeno. Se realizó la regresión lineal de la figura 33, a partir de la pendiente de las misma se compararon velocidades de crecimiento radial promedio de la cepa en su enfrentamiento contra cada patógeno, cómo también como varían en comparación con los controles.

Regresión lineal. [crecimiento radial promedio]=m.[tiempo]+h			
<i>Trichoderma spp</i> 20NAR3 frente a <i>B cinerea</i>	m = 3,1cm/día h=-1,66cm	<i>B cinerea</i> frente a <i>Trichoderma spp</i> 20NAR3	No hubo crecimiento por parte del patógeno
<i>Trichoderma spp</i> 20NAR3 frente a <i>A.alternata</i>	m = 1,50cm/día h=-0,28cm	<i>A.alternata</i> frente a <i>Trichoderma spp</i> 20NAR3	m= 0,63cm/día h=1,8cm
<i>Trichoderma spp</i> 20NAR3 frente a <i>F.oxysporum</i>	m= 1,66cm/día h=-0,36cm	<i>F.oxysporum</i> frente a <i>Trichoderma spp</i> 20NAR3	m= 0,50cm/día h=0cm

Los resultados expuestos en la figura 33 y en la tabla 7, en conjunto con los valores de las tablas 4 y 5, permiten concluir que enfrentar la cepa *Trichoderma spp* 20NAR3 a los tres fitopatógenos solamente aumentó su velocidad de crecimiento al enfrentarla contra el patógeno *B. cinérea*; el cuál, por su parte, no logró crecer con el transcurso de los días por ser micoparasitado por su antagonista.

En los enfrentamientos restantes se observó que tanto la cepa de *Trichoderma* como *A. alternata* disminuyeron su velocidad de crecimiento al estar en competencia en la misma placa de Petri. Por otro lado *F. oxysporum* mantuvo su velocidad de crecimiento radial promedio tanto en presencia de la cepa de *Trichoderma* como en ausencia de la misma.



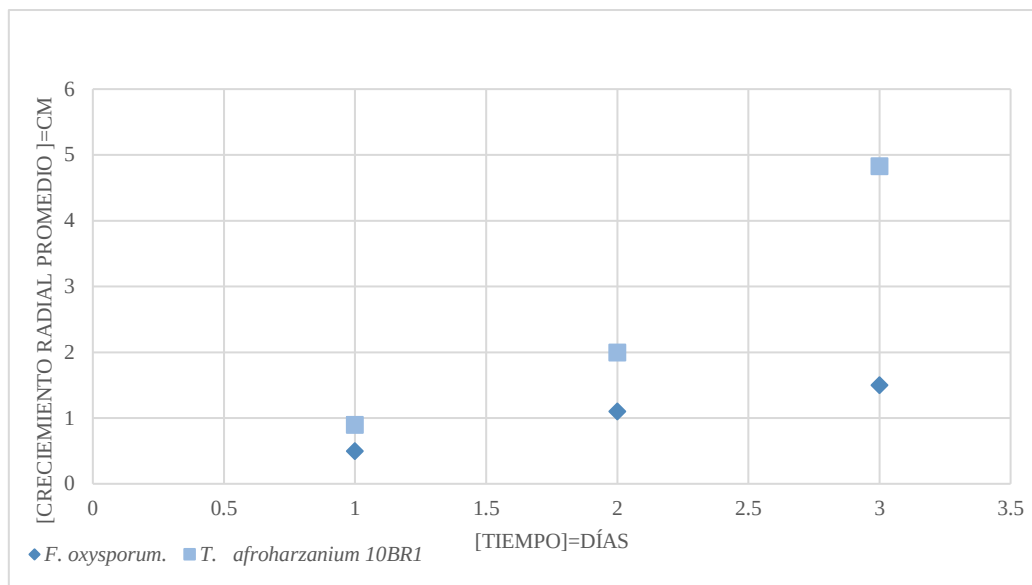


Figura 33 Cinética de crecimiento de la cepa *T. afroharzianum* 10BR1. Valores obtenidos de la medición durante 3 días de los centímetros avanzados radialmente por día, promediado los valores laterales con el central que fueron tomados a partir del centro del disco de 7mm sembrado. Frente a los patógenos *B. cinerea*, *A. alternata* y *F. oxysporum*.

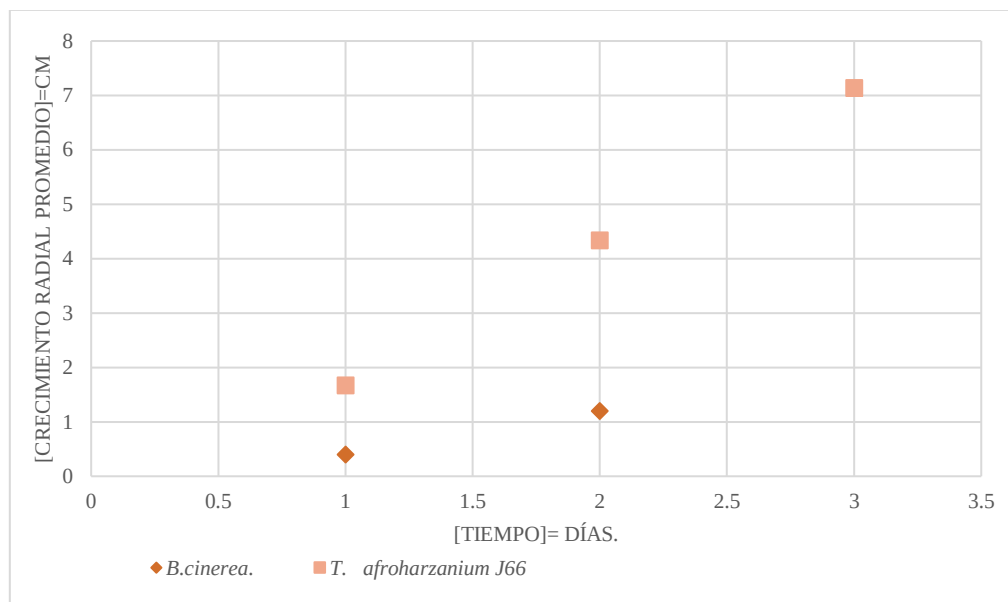
Tabla 8: Ecuaciones obtenidas de los enfrentamientos de *T. afroharzianum* 10BR1 frente a cada patógeno. Se realizó la regresión lineal de la figura 33, a partir de la pendiente de las misma se compararon velocidades de crecimiento radial promedio de la cepa tanto en el enfrentamiento contra cada patógeno, cómo también como varían en comparación con los controles.

Regresión lineal. [crecimiento radial promedio]=m.[tiempo]+h			
<i>T. afroharzianum</i> 10BR1 frente a <i>B. cinerea</i>	m = 2,11cm/día h= -0,17cm	<i>B. cinerea</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> 10BR1	m = 0,63cm/día h=-0,41 cm
<i>T. afroharzianum</i> 10BR1 frente a <i>A. alternata</i>	m= 3,36cm/día h= -2,35 cm	<i>A. alternata</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> 10BR1	m = 0,98cm/día h=0,72cm
<i>T. afroharzianum</i> 10BR1 frente a <i>F. oxysporum</i>	m = 1,95cm/día h=-1,35cm	<i>F. oxysporum</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> 10BR1	m = 0,50cm/día h=0,03cm

Con los resultados de la figura 33 y las tablas 4, 5 y 8 se puede concluir que la cepa *T. afroharzianum* 10BR1 disminuyó su velocidad de crecimiento promedio radial al

enfrentarla a *F. oxysporum* de 0,15 cm/día; en cambio aumentó la velocidad de crecimiento radial promedio al enfrentarla a *A. alternata*, con un aumento de 1,26 cm/día. Al enfrentarla al patógeno *B. cinerea* no hubo variancia en la velocidad de crecimiento radial promedio.

Por el lado de los patógenos, se observa que *F. oxysporum* mantuvo constante su velocidad de crecimiento radial promedio en 0,5 cm /día, *A. alternata* disminuyó su velocidad de crecimiento radial promedio de 1.31 cm/día a 0.98 cm/día y *B. cinerea* aumentó su velocidad de crecimiento radial promedio en 0.05 cm/día.



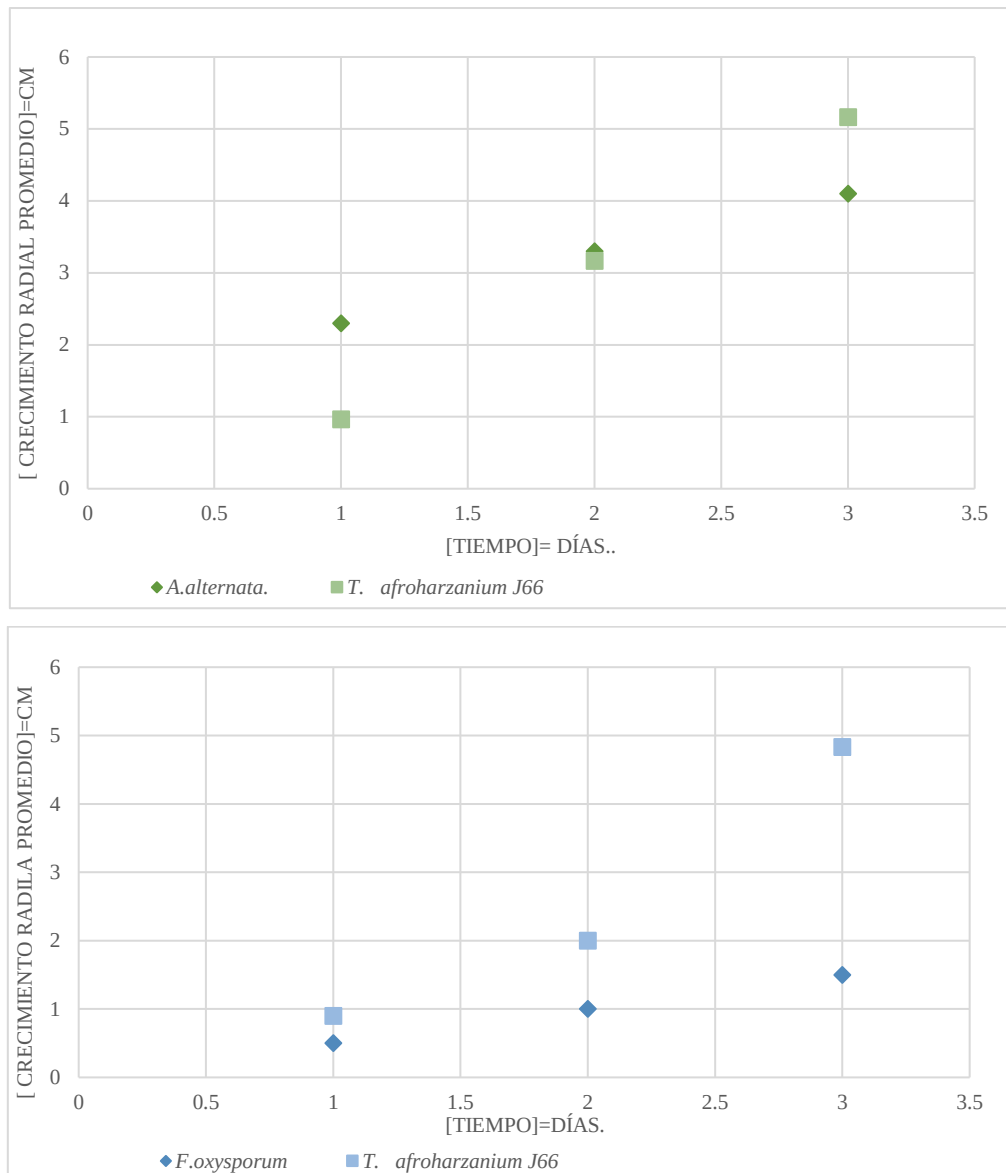
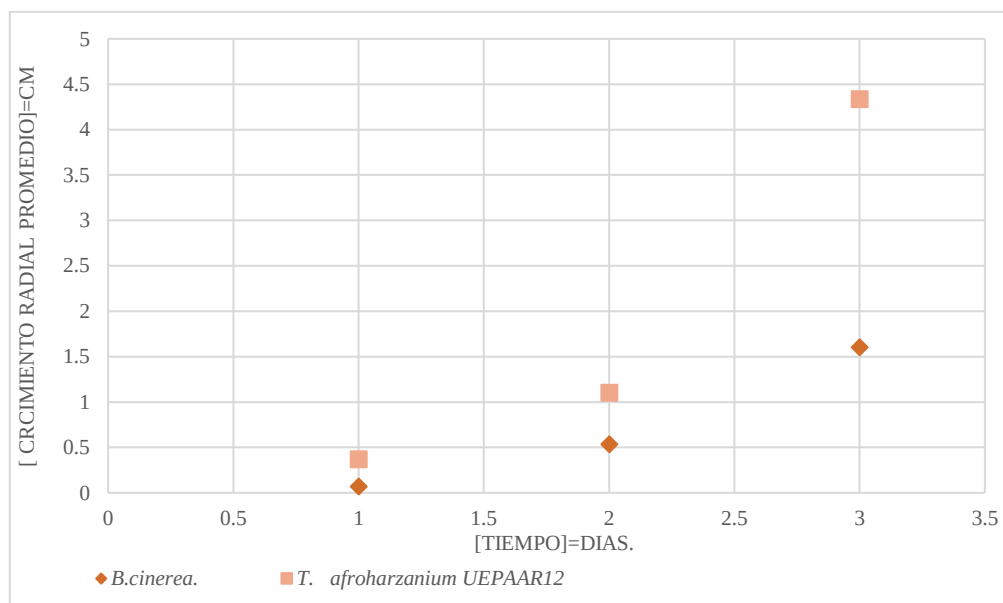


Figura 34: Cinética de crecimiento de la cepa *T. afroharzianum* J66. Valores obtenidos de la medición durante 3 días de los centímetros avanzados radialmente por día, promediado los valores laterales con el central que fueron tomados a partir del centro del disco de 7mm sembrado. Frente a los patógenos *B. cinerea*, *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Tabla 9: Ecuaciones obtenidas de los enfrentamientos de *T. afroharzianum* J66 frente a cada patógeno. Se realizó la regresión lineal de la figura 34, a partir de la pendiente de las misma se compararon velocidades de crecimiento radial promedio de la cepa tanto en enfrentamiento contra cada patógeno, cómo también como varían en comparación con los controles.

Regresión lineal. [crecimiento radial promedio]=m.[tiempo]+h			
<i>T. afroharzianum</i> J66 frente a <i>B. cinerea</i>	m = 2,73cm/día h=-1,08cm	<i>B. cinerea</i> frente a <i>T.afroharzianum</i> J66	m = 0,83cm/día h= -0,40cm
<i>T. afroharzianum</i> J66 frente a <i>A.alternata</i>	m= 2,10cm/día h=-1,10cm	<i>A.alternata</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> J66	m= 0,90cm/día h=1,43cm
<i>T.afroharzianum</i> J66 frente a <i>F.oxysporum</i>	m = 1,96cm/día. h=-1,35cm	<i>F.oxysporum</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> J66	m= 0,50cm/día h=0cm

Las regresiones lineales para los enfrentamientos de *T. afroharzianum* J66 fueron realizadas frente a los tres patógenos y se comparó con las pendientes control, tanto de la cepa en estudio como los controles de los patógenos. Se obtuvo que la cepa *T. afroharzianum* J66 frente a *B. cinerea* aumentó su velocidad de crecimiento radial promedio en 0,55 cm/día, mientras que frente a *alternata* y *F. oxysporum* disminuyó su velocidad de crecimiento radial promedio 0.08cm/día y 0.22 cm /día. *A. alternata* por su parte presentó una disminución en la velocidad de 0.41 cm/día, *F. oxysporum* se mantuvo constante y *B. cinerea* aumentó su velocidad de crecimiento radial en 0.25 cm/día (Figura 34, Tabla 4, Tabla 5 y Tabla 9)



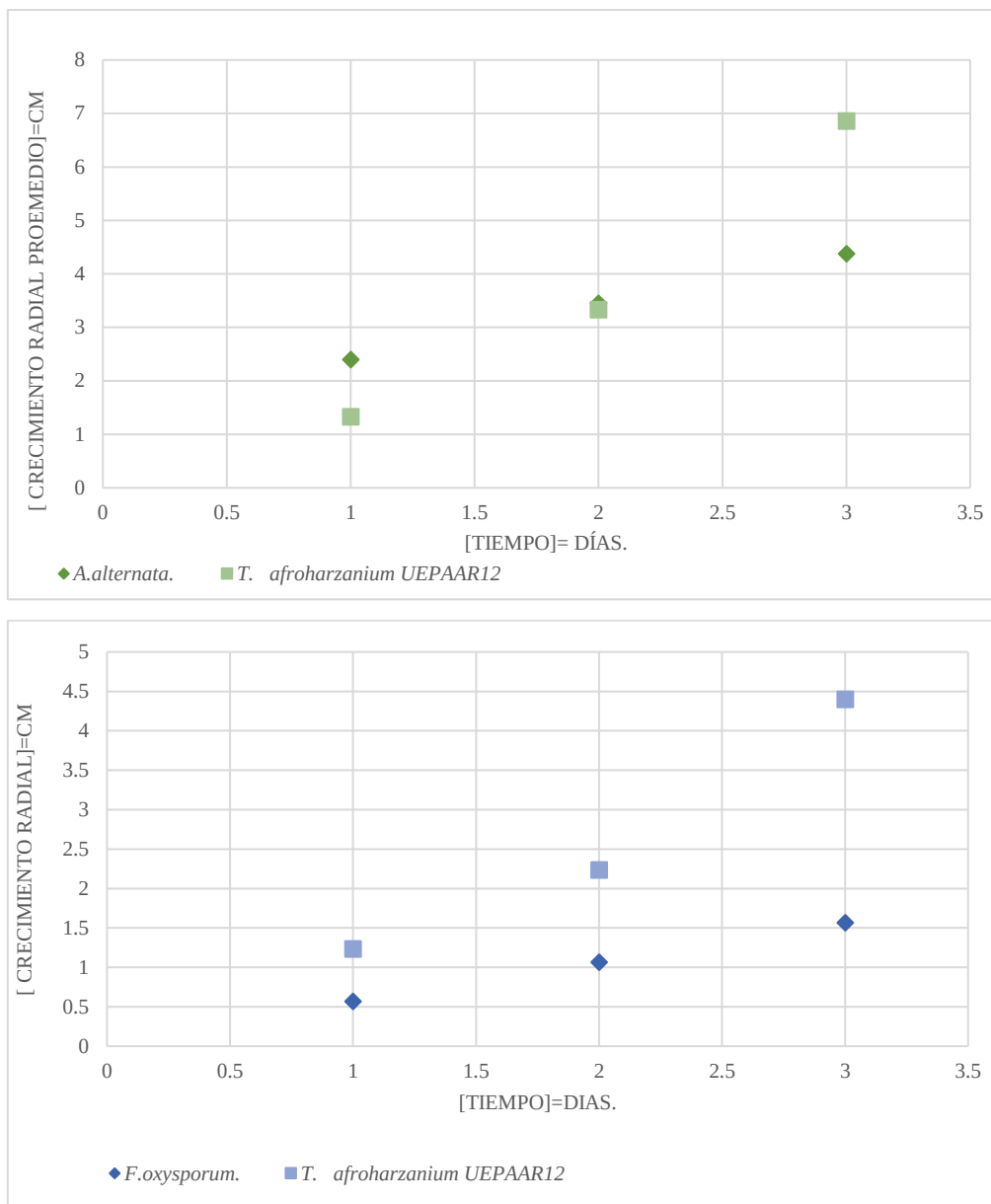


Figura 35. Cinética de crecimiento de la cepa *T. afroharzianum* UEPAAR12. Valores obtenidos de la medición durante 3 días de los centímetros avanzados radialmente por día, promediado los valores laterales con el central que fueron tomados a partir del centro del disco de 7mm sembrado. Frente a los patógenos *B. cinerea*, *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Tabla 10: Ecuaciones obtenidas de los enfrentamientos de *T. afroharzianum* UEPAAR12 frente a cada patógeno. Se realizó la regresión lineal de la figura 35, a partir de la pendiente de las misma se compararon velocidades de crecimiento radial promedio de la cepa en su enfrentamiento contra cada patógeno, cómo también como varían en comparación con los controles.

Regresión lineal. [crecimiento radial promedio]=m.[tiempo]+h			
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR12 frente a <i>B. cinerea</i>	m=1,93cm/día h= -2,03cm	<i>B. cinerea</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> UEPAAR12	m= 0,76cm/día h=-0,80cm
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR12 frente a <i>A. alternata</i>	m= 2,76cm/día h=-1,69	<i>A. alternata</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> UEPAAR12	m = 0,99cm/día h=1,43cm
<i>T. afroharzianum</i> UEPAAR12 frente a <i>F. oxysporum</i>	m= 1,58cm/día h=-0,54cm	<i>F. oxysporum</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> UEPAAR12	m= 0,50cm/día h=0,06cm

En base a las pendientes obtenidas se pudo observar que la cepa *T. afroharzianum* UEPAAR12 presentó un incremento en la velocidad de crecimiento radial promedio al enfrentarse al patógeno *A. alternata*, aumentando su crecimiento radial promedio en 0.36 cm/día. En contraste, el mismo patógeno presentó una disminución en su velocidad de crecimiento radial promedio de 0.31 cm/día en comparación con la velocidad obtenida para el control.

Los enfrentamientos restantes presentaron una disminución en velocidad de crecimiento radial por parte de la cepa de *Trichoderma*, mientras que el patógeno *F. oxysporum* mantuvo constante su velocidad crecimiento comparado con la pendiente control y *B. cinerea* aumentó su velocidad de crecimiento radial promedio en 0.18 cm/día. (Figura 35, Tablas 4, 5 y 10)

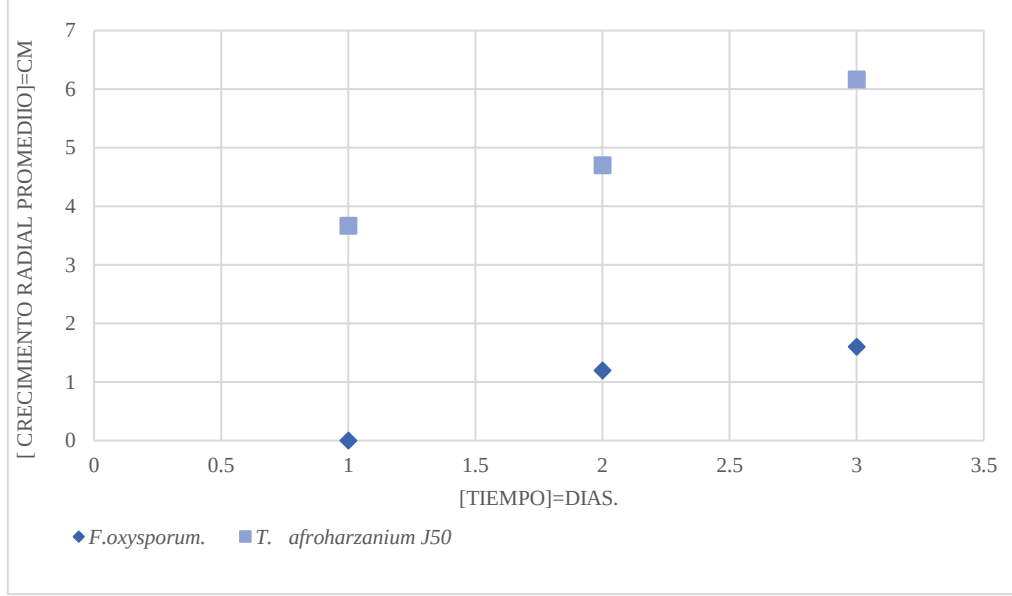
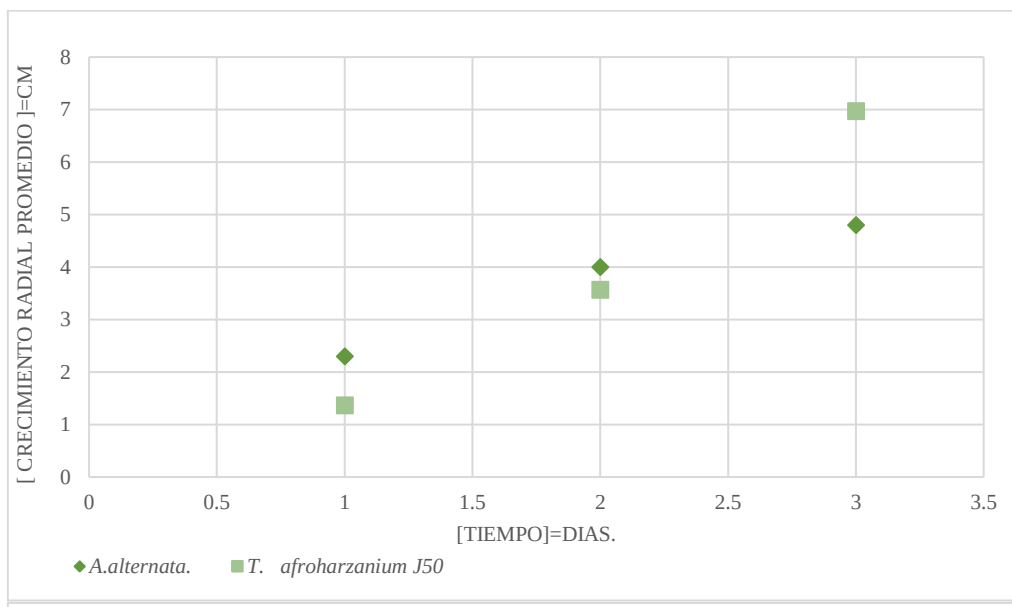
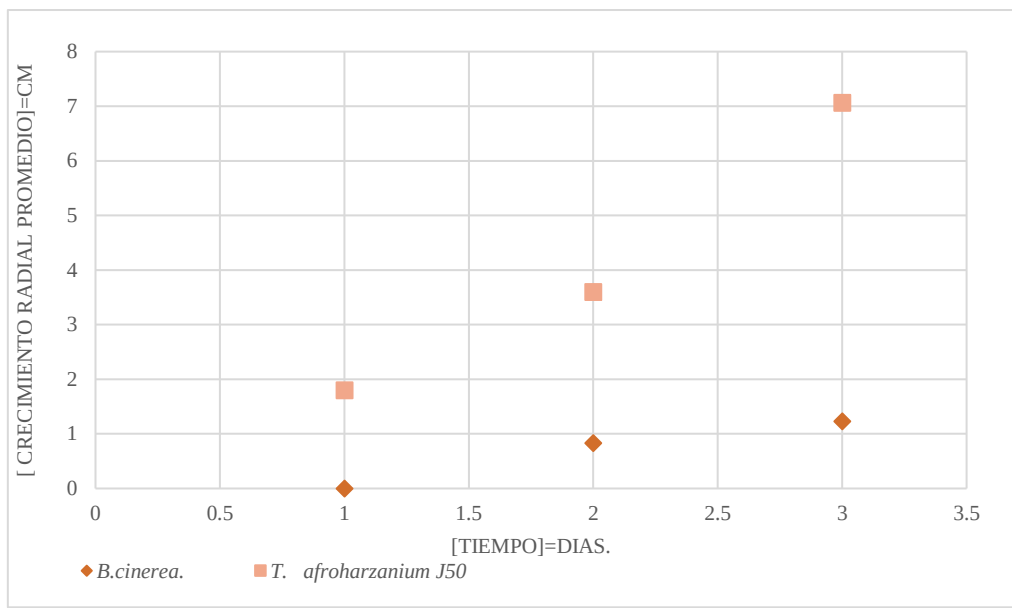


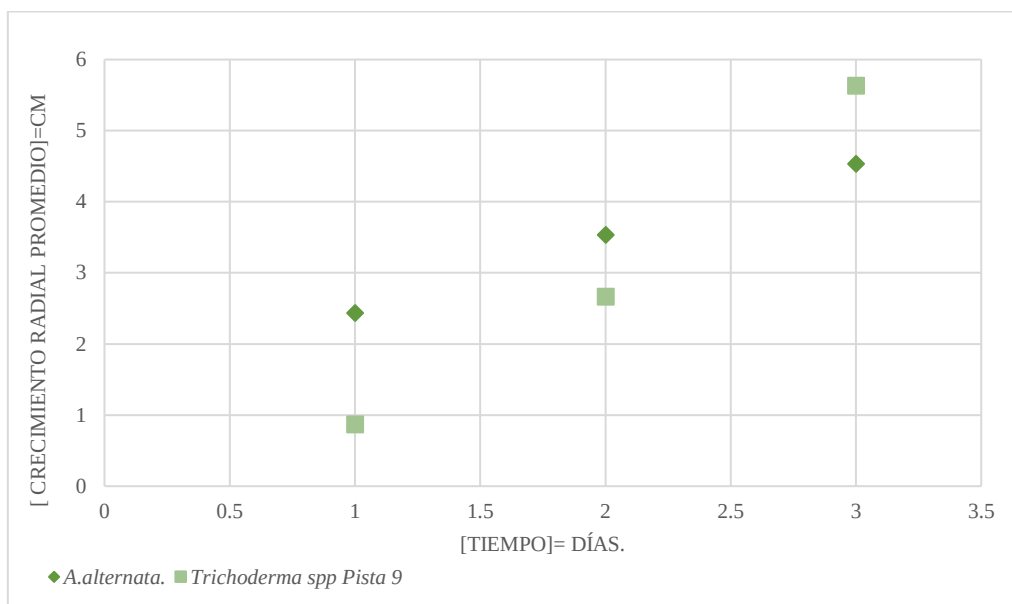
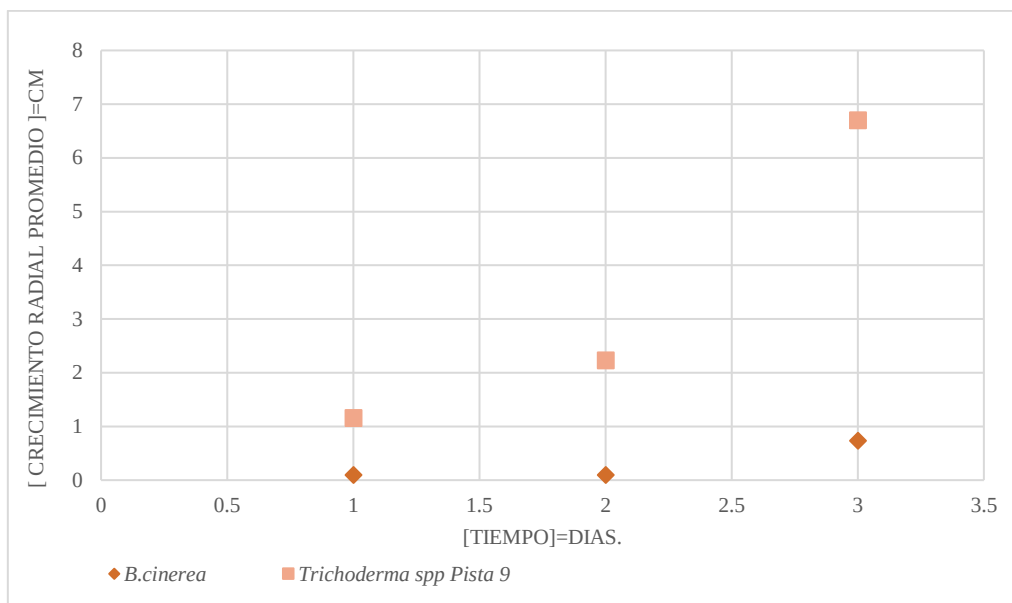
Figura 36: Cinética de crecimiento de la cepa *T. afroharzianum* J50 Valores obtenidos de la medición durante 3 días de los centímetros avanzados radialmente por día, promediado los valores laterales con el central que fueron tomados a partir del centro del disco de 7mm sembrado. Frente a los patógenos *B. cinerea*, *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Tabla 11: Ecuaciones obtenidas de los enfrentamientos de *T. afroharzianum* J50 frente a cada patógeno. Se realizó la regresión lineal de la figura 36, a partir de la pendiente de las misma se compararon velocidades de crecimiento radial promedio de la cepa en su enfrentamiento contra cada patógeno, cómo también como varían en comparación con los controles.

Regresión lineal. [crecimiento radial promedio]=m.[tiempo]+h			
<i>T. afroharzianum</i> J50 frente a <i>B. cinerea</i>	m=2,63cm/día h= -1,11cm	<i>B. cinerea</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> J50	m = 0,61 h=-0,54
<i>T. afroharzianum</i> J50 frente a <i>A. alternata</i>	m= 2,80cm/día h=-1,63cm	<i>A. alternata</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> J50	m= 1,25cm/día h=1,20cm
<i>T. afroharzianum</i> J50 frente a <i>F. oxysporum</i>	m=1,25cm/día h=2,43cm	<i>F. oxysporum</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> J50	m=0,80cm/día h=-0,66cm

La velocidad de crecimiento radial promedio para la cepa *T. afroharzianum* J50 control fue de 3,15 cm/días, mientras que al enfrentarla a los patógenos se observa que disminuyó su velocidad a, 2,63 cm/día frente a *B. cinerea*, 2,80 cm/día frente a *A. alternata* y 1,25 cm/día frente a *F. oxysporum*. Distinto fue lo ocurrido para los patógenos, *B. cinerea* y *F. oxysporum* que presentaron un aumento en la velocidad de crecimiento radial promedio mientras que *A. alternaria* disminuyó 0,06 cm/día.

(Figura 36, Tablas 4, 5 y 11)



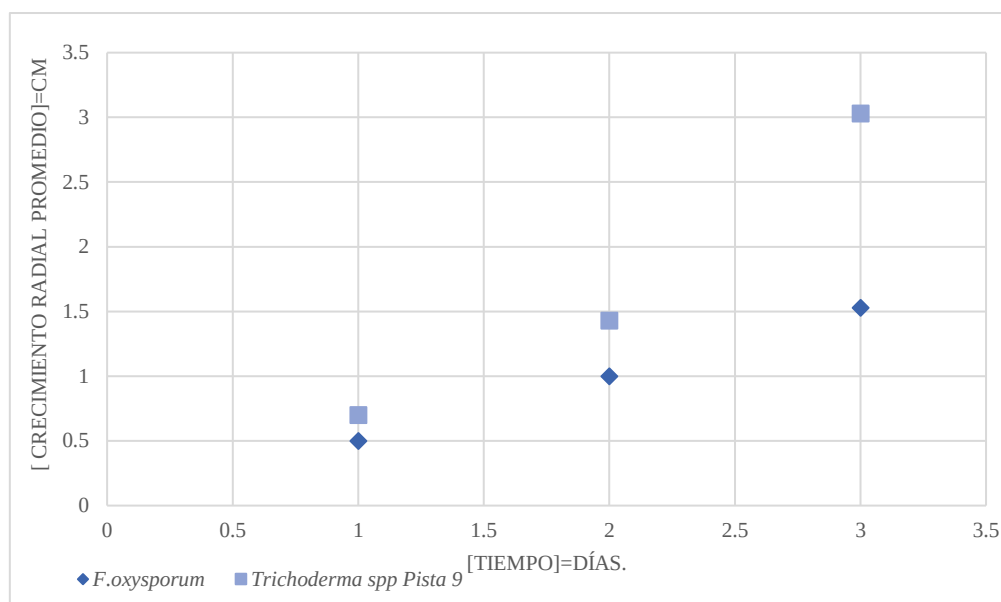


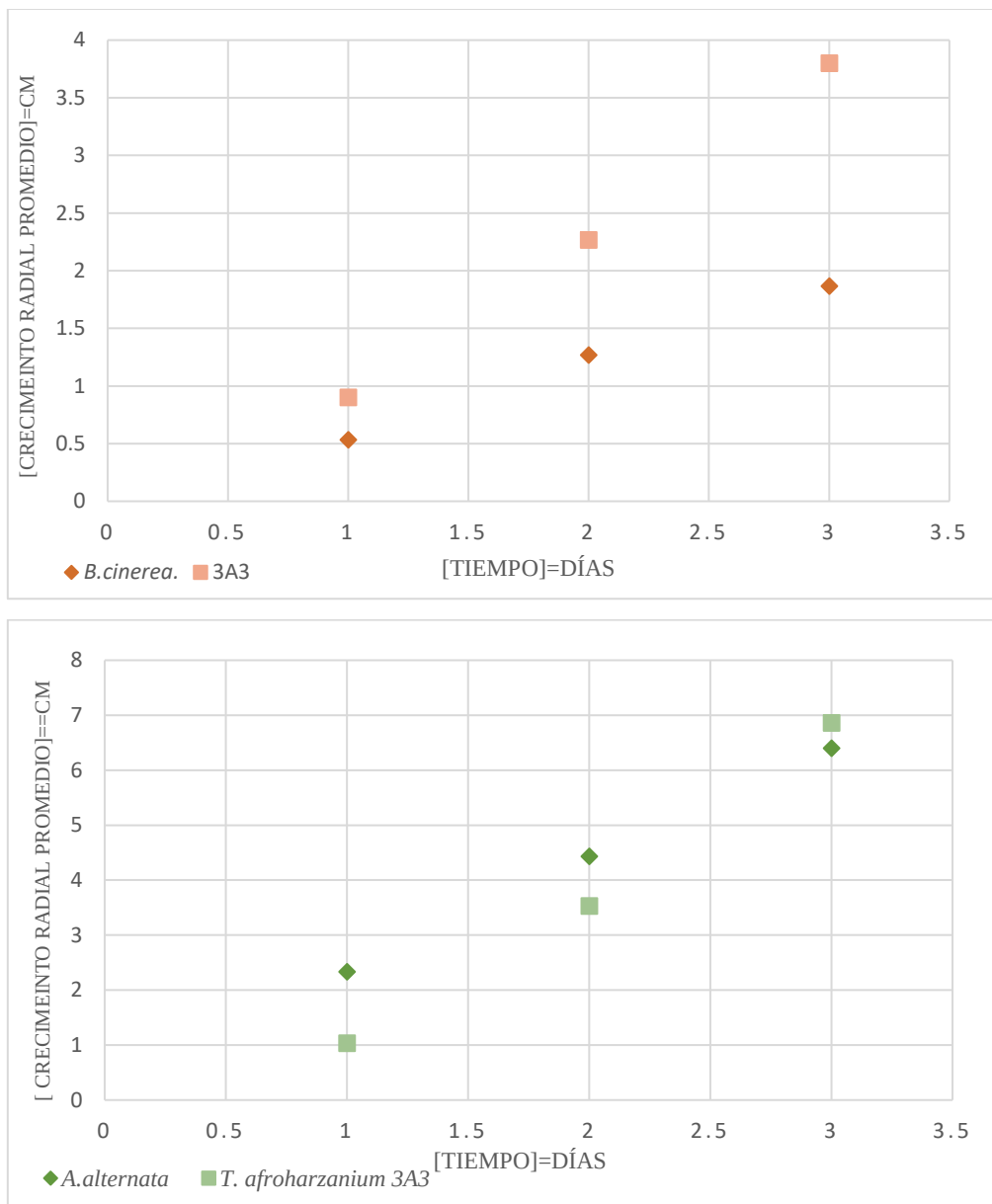
Figura 37: Cinética de crecimiento de la cepa *Trichoderma spp* Pista 9. Valores obtenidos de la medición durante 3 días de los centímetros avanzados radialmente por día, promediado los valores laterales con el central que fueron tomados a partir del centro del disco de 7mm sembrado. Frente a los patógenos *B. cinerea*, *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Tabla 12: Ecuaciones obtenidas de los enfrentamientos de *Trichoderma spp* Pista 9 frente a cada patógeno. Se realizó la regresión lineal de la figura 37, a partir de la pendiente de las misma se compararon velocidades de crecimiento radial promedio de la cepa en su enfrentamiento contra cada patógeno, cómo también como varían en comparación con los controles.

Regresión lineal	[crecimiento radial promedio]=m.[tiempo]+h		
<i>Trichoderma spp</i> Pista 9 frente a <i>B. cinerea</i>	m = 2,77 cm/día h=-2,17	<i>B. cinerea</i> frente a <i>Trichoderma spp</i> Pista 9	m = 0,31 cm/día h=-0,32cm
<i>Trichoderma spp</i> Pista 9 frente a <i>A. alternata</i>	m = 2,38cm/día h=-1,70cm	<i>A. alternata</i> frente a <i>Trichoderma spp</i> Pista 9	m= 1,05cm/día h=1,40cm
<i>Trichoderma spp</i> Pista 9 frente a <i>F. oxysporum</i>	m = 1,65 cm/día h=-0,61cm	<i>F. oxysporum</i> frente a <i>Trichoderma spp</i> Pista 9	m= 0,51 cm/día h=-0,02cm

Las gráficas de crecimiento y las pendientes de las rectas obtenidas permiten evidenciar que la cepa de *Trichoderma spp* Pista 9 disminuyó su velocidad de crecimiento radial promedio en presencia de los patógenos en el enfrentamiento *in vitro*, la velocidad control de la misma fue 3,43 cm/día, mientras que frente a *B. cinerea* fue de 2,77 cm/día, *A. alternata* 2,38 cm/día y para *F. oxysporum* 1,65.

Para los patógenos se observó que *F. oxysporum* no varió su velocidad de crecimiento radial promedio en presencia de la cepa de *Trichoderma*, no así lo hicieron los dos patógenos restantes que presentaron una disminución en la velocidad de crecimiento radial promedio de 1,31 cm/día a 1,05 cm/día (*A. alternata*) y de 0,58cm/día a 0.31 cm/día (*B. cinerea*). (Figura 37; Tablas 4, 5 y 12)



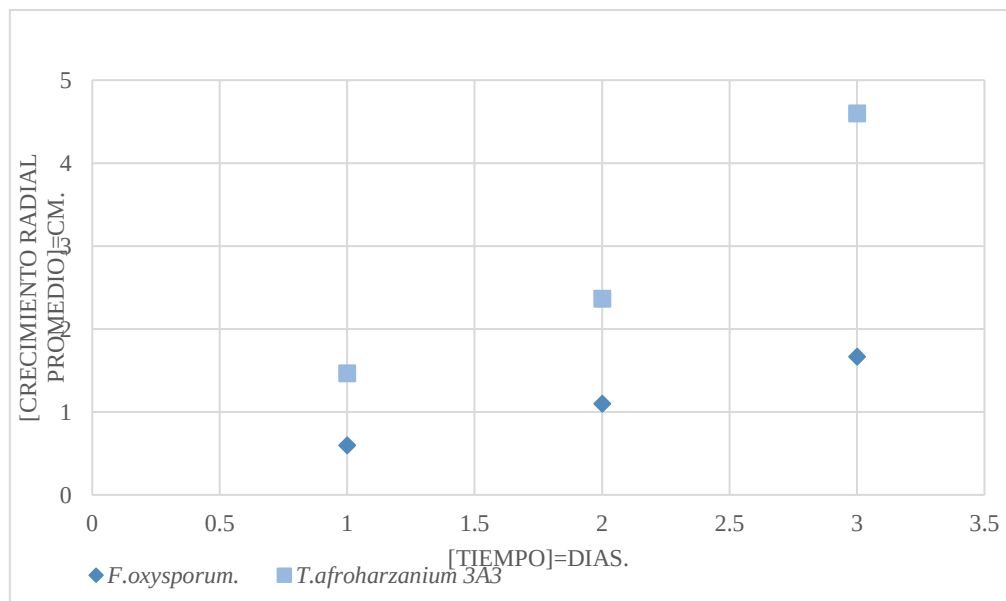


Figura 38 Cinética de crecimiento de la cepa *T. afroharzianum* 3A3. Valores obtenidos de la medición durante 3 días de los centímetros avanzados radialmente por día, promediado los valores laterales con el central que fueron tomados a partir del centro del disco de 7mm sembrado. Frente a los patógenos *B. cinerea*, *A. alternata* y *F. oxysporum*.

Tabla 13: Ecuaciones obtenidas de los enfrentamientos de *T. afroharzianum* 3A3 frente a cada patógeno. Se realizó la regresión lineal de la figura 38, a partir de la pendiente de las misma se compararon velocidades de crecimiento radial promedio de la cepa en su enfrentamiento contra cada patógeno, cómo también como varían en comparación con los controles.

Regresiones lineales	[crecimiento radial promedio]=m.[Tiempo]+h		
<i>T. afroharzianum</i> 3A3 frente a <i>B. cinerea</i>	m= 1,45cm/día h=0,57cm	<i>B. cinerea</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> 3A3	m=0,66cm/día h= -0,11 cm
<i>T. afroharzianum</i> 3A3 frente a <i>A. alternata</i>	m=2,91 cm/día h=-2,02	<i>A. alternata</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> 3A3	m= 2,03cm/día h=0,33cm
<i>T. afroharzianum</i> 3A3 frente a <i>F. oxysporum</i>	m = 1,56cm/día h=-0,32	<i>F. oxysporum</i> frente a <i>T. afroharzianum</i> 3A3	m = 0,53cm/día h=0,05cm

En el análisis realizado sobre las pendientes de las rectas que presentan los patógenos y la cepa de *Trichoderma* se obtuvo un decrecimiento en la velocidad de crecimiento radial promedio por parte de la cepa *T. afroharzianum* 3A3 al enfrentarla a los patógenos *B. cinerea* y *F. oxysporum*, disminuyó su velocidad de crecimiento de

2,35 cm/día a 1,45cm/día y 1,56 cm/día correspondientemente. Se observó que frente al patógeno *A. alternata* la cepa de *Trichoderma* aumentó su velocidad de crecimiento radial promedio en 0,44 cm/día.

Los patógenos *A. alternata* y *B. cinerea* presentaron un aumento en la velocidad de crecimiento radial promedio, mientras que el patógeno *F. oxysporum* no varió su velocidad en comparación con el control. (Figura 38; Tablas 4,5, y 13)

6.4.6.4. Análisis de peptaiboles producidos durante los enfrentamientos

En base a los enfrentamientos obtenidos se decidió analizar los halos producidos *in vitro* entre las cepas de *Trichoderma* y *F. oxysporum*. Se les realizó un protocolo de extracción total de peptaiboles totales a los enfrentamientos duales y se los analizó mediante cromatografía HPLC a una detección de longitud de onda de 220nm.

Se eligió como patógeno *F. oxysporum* debido a que es el principal patógeno en estudio en la actualidad en el grupo de investigación.

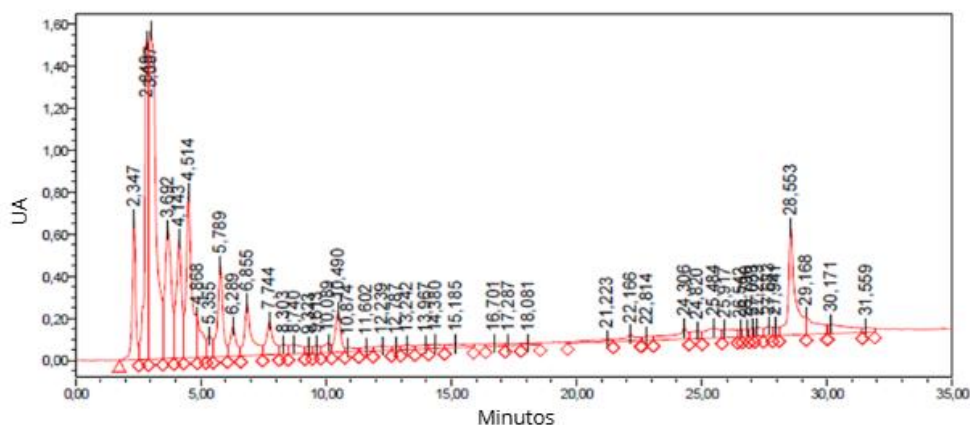


Figura 39: Cromatograma control medio PDA. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

Se realizó el cromatograma de PDA en forma de control y se observaron los distintos picos característicos del medio que fueron a los 4,143 min;4,514 min;5,789 min; 6,855 min;10,49 min y 28 min. (Figura 39)

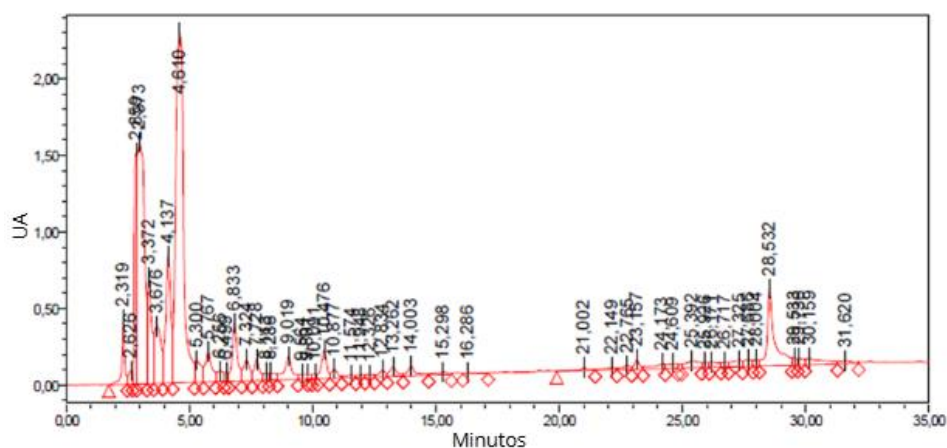


Figura 40: Cromatograma control *F. oxysporum*. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

En forma de control se realizó el barrido cromatográfico del patógeno *F. oxysporum* para reconocer sus picos, los cuales se encontraron a 4,610 min, también se encontraron los picos característicos del medio PDA a 4,137 min; 6,833 min; 10,476 min y 28,532. (Figura 40).

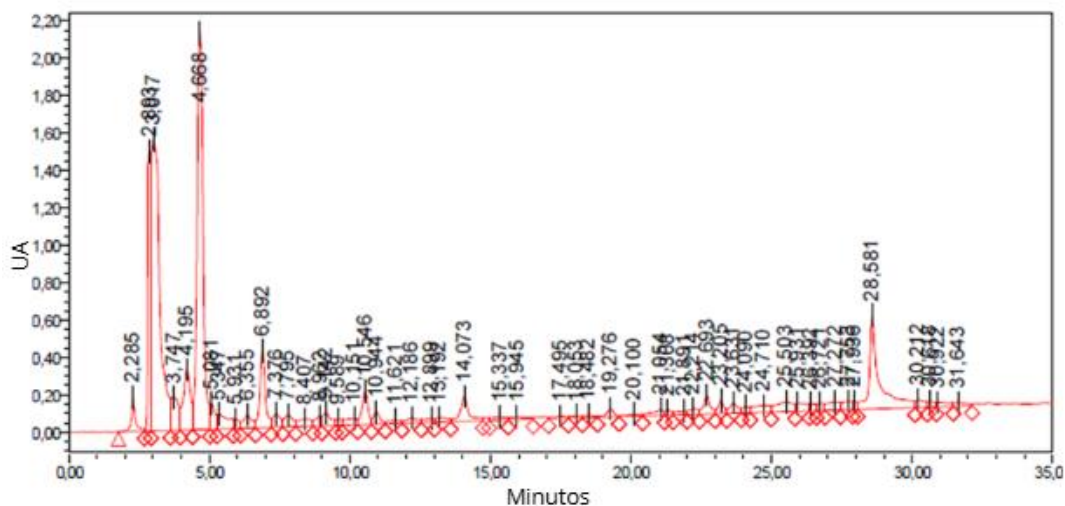


Figura 41: Cromatograma *T. afroharzianum* UEPAR5. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

El barrido cromatográfico de la extracción total de peptaiboles de la cepa UEPAR5 presentó los picos a 4,195min; 6,668 min; 10,546 min y 28,581 min, característicos

del medio PDA y también se puede encontrar un pico correspondiente a la cepa que se encuentra a los 4,668 min. (Figura 41).

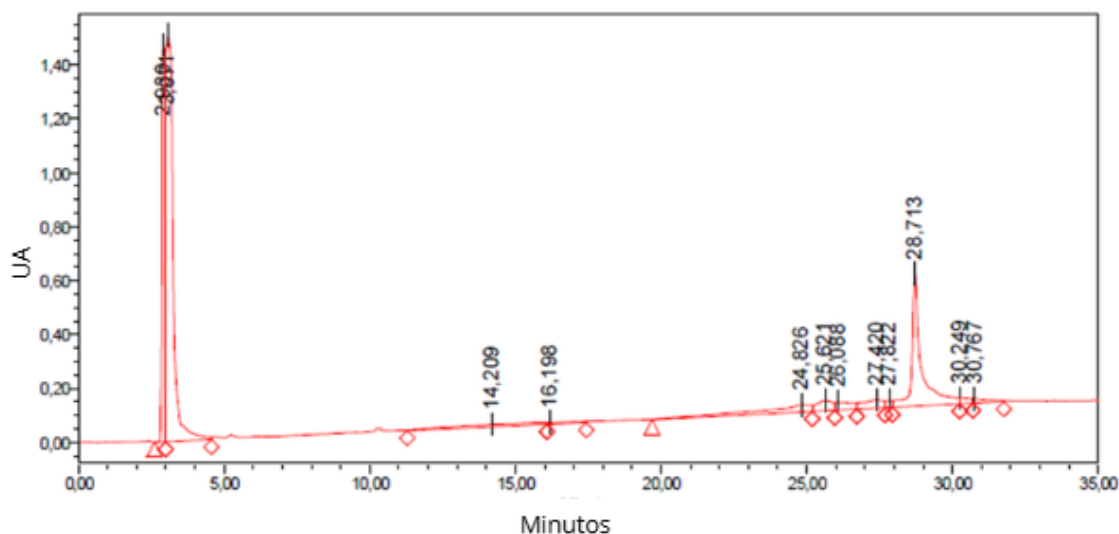


Figura 42: Cromatograma del enfrentamiento *T. afroharzianum* UEPA AR5/*F. oxysporum*. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

El barrido cromatográfico de la extracción total de peptaiboles presentó picos correspondientes al medio PDA.

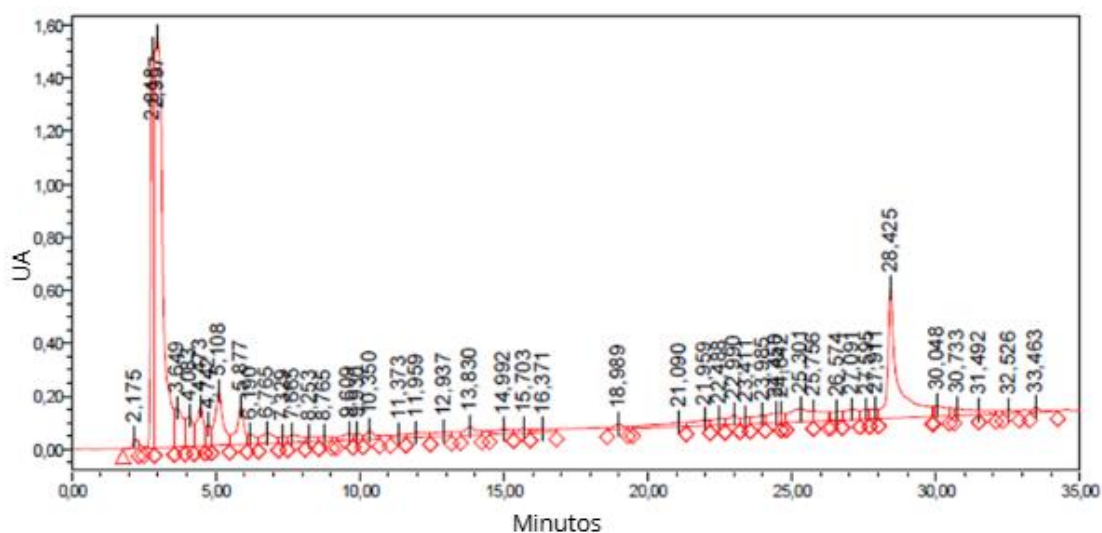


Figura 43: Cromatograma *Trichoderma* spp cepa 20NAR3. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

El cromatograma de la extracción total de peptaiboles de la cepa *Trichoderma* spp 20NAR3 exhibió un pico exclusivo a los 5,108 min. (Figura 43)

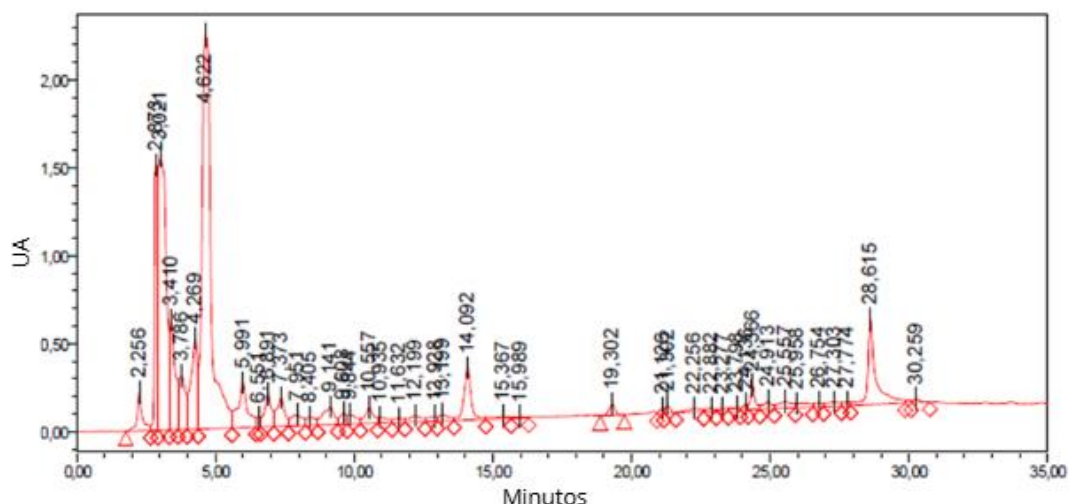


Figura 44: Cromatograma del enfrentamiento *Trichoderma* spp cepa 20NAR3/F.

***oxysporum*.** Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

La imagen del cromatograma correspondiente al enfrentamiento *Trichoderma* spp 20NAR3 y *F. oxysporum* presentó los picos a 4,269 min; 5,991min;14,092 min que son exclusivos de la extracción total de peptaiboles realizadas del enfrentamiento de la cepa 3A3 y *F. oxysporum*, además se puede observar un pico a los 4,662 min correspondiente al patógeno *F. oxysporum*. (Figura 44).

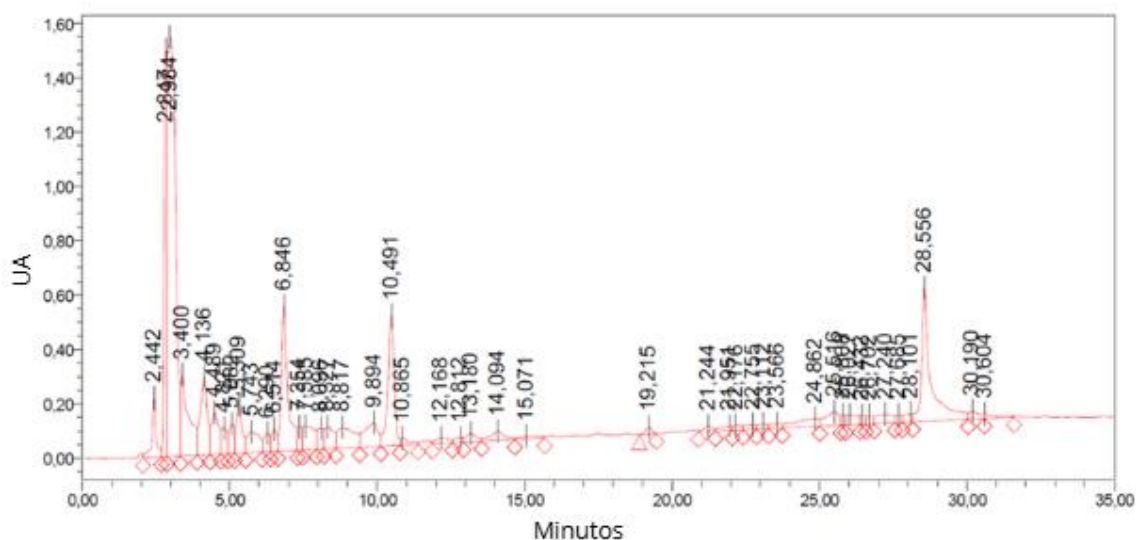


Figura 45: Cromatograma *T. afroharzianum* 10BR1. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

El cromatograma obtenido exhibió los picos característicos del medio APD a los siguientes tiempos: 4,136; 6,846; 10,491 y 28,556min. (Figura 45).

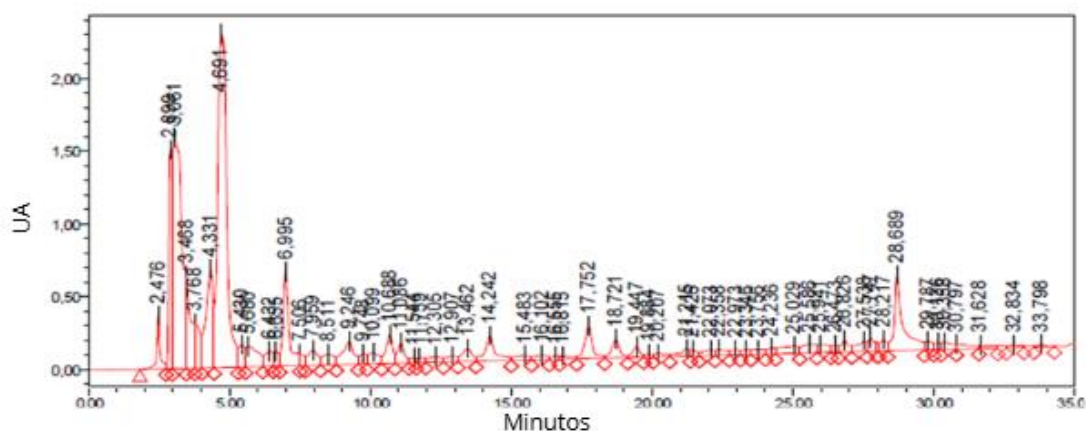


Figura 46: Cromatograma del enfrentamiento *T. afroharzianum* 10BR1/*F. oxysporum*. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

La figura 47 muestra los picos del medio APD a los 4,331 min; 6,995 min y 28,689 min, los picos debido al patógeno a los 4,691 min, además, los picos exclusivos correspondientes a los metabolitos producidos durante el enfrentamiento a los 14,242min; 17,752 min y 18,721 min. (Figura 46).

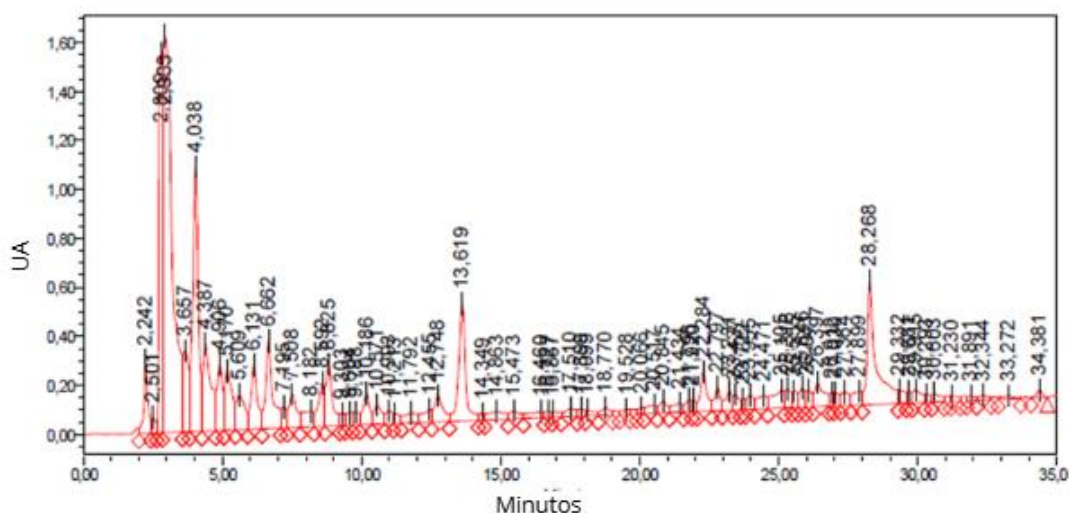


Figura 47: Cromatograma *T. afroharzianum* J66. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

El cromatograma realizado de la cepa *Trichoderma* J66 presentó los siguientes picos; a los 4,036 min y 28min, correspondiente al medio PDA, a los 6,662 min y a los 13,619 min, correspondientes a *Trichoderma* spp. (Figura 47).

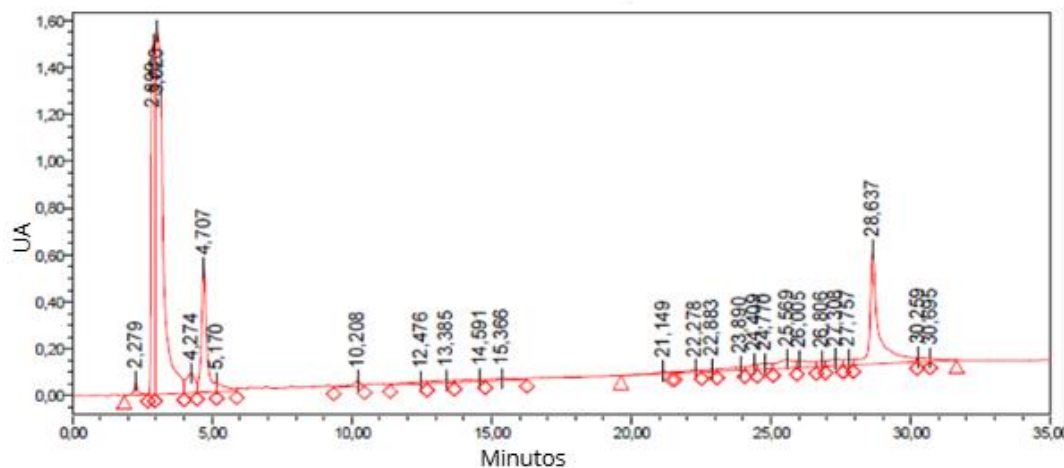


Figura 48: Cromatograma del enfrentamiento *T. afroharzianum* J66/*F. oxysporum*. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

Se puede observar en la figura 46 los picos 4,707 min correspondiente a metabolitos producidos durante el enfrentamiento *in vitro* y el pico correspondiente al PDA a los 28,637 min. (Figura 48)

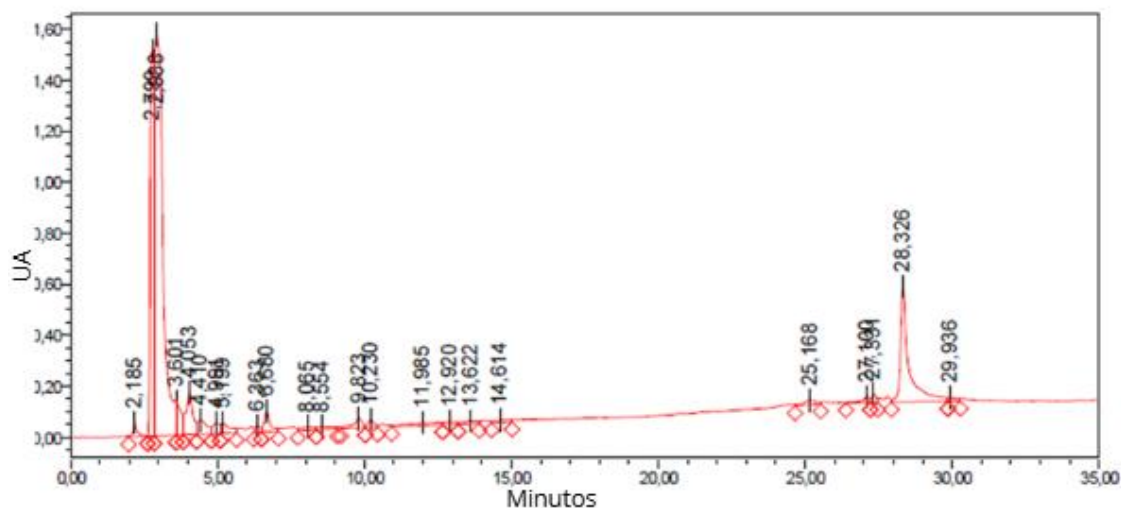


Figura 49: Cromatograma *T. afroharzianum* UEPAAR12. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

En el cromatograma se puede observar el pico correspondiente al PDA a los 28,326min. (Figura 49)

En el cromatograma expuesto en la figura 49 se pueden observar los siguientes picos; a los 4,188 min y 28,463 min correspondientes al medio PDA, a los 5,296 min, a los 7,961 min correspondientes a la cepa *Trichoderma* spp. (Figura 51).

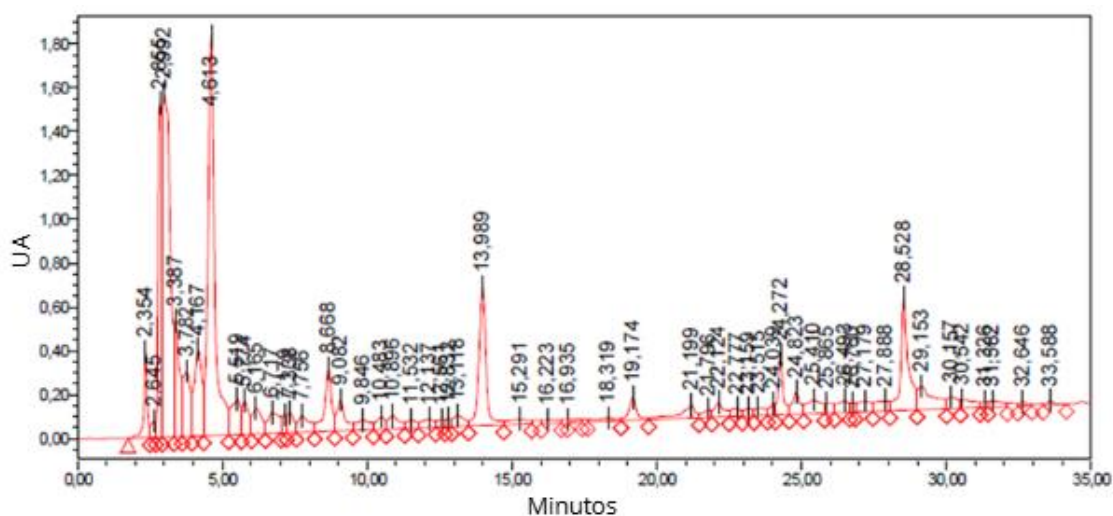


Figura 52: Cromatograma del enfrentamiento *T. afroharzianum* J50/*F. oxysporum* Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

El cromatograma de la extracción total de peptaiboles del enfrentamiento de la cepa J50 y el patógeno *F. oxysporum* presentó picos correspondientes a PDA a los 28,528 y 4,167 min, además presentó un pico correspondiente a *F. oxysporum* a los 4,613 min y picos exclusivos de metabolitos secundarios a los 8,668min y 13,989 min. (Figura 52).

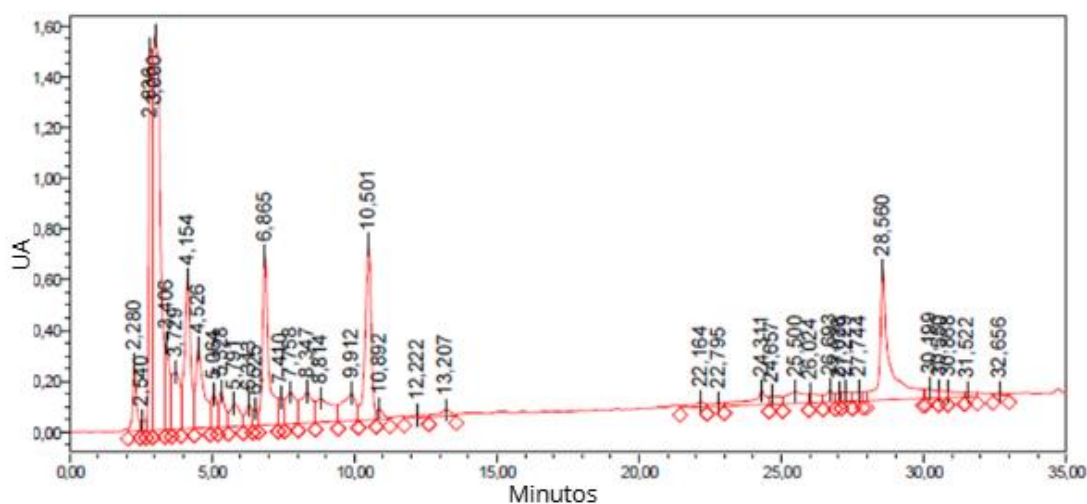


Figura 53: Cromatograma cepa *Trichoderma* spp Pista9. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

En la figura 53 se pueden observar los picos a los 4,154min; 6,65min;10,501min; 28,560 minutos correspondientes al medio PDA, además se encuentra un pico a los 4,526 min correspondientes a la cepa de *Trichoderma spp*.

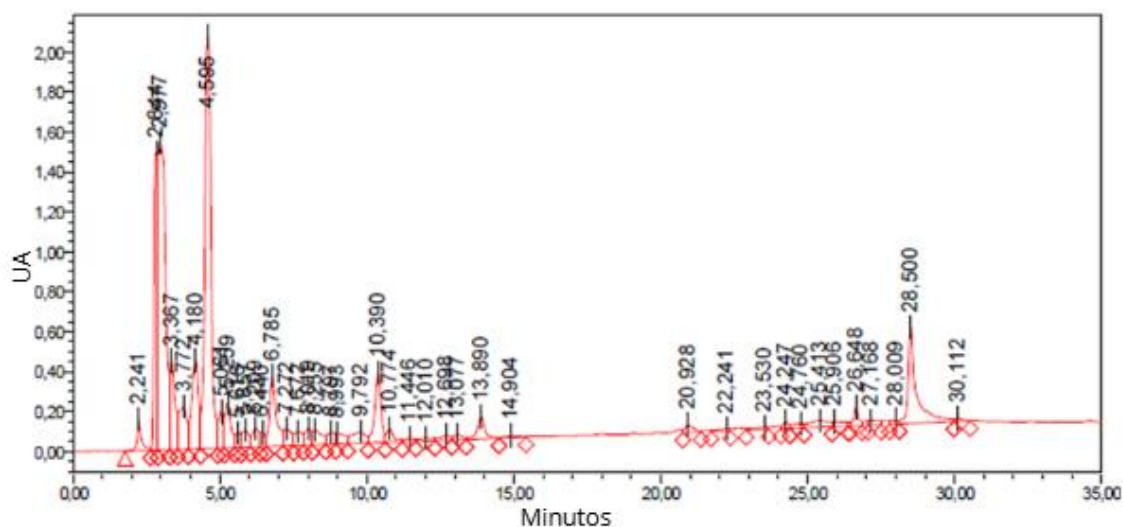


Figura 54: Cromatograma del enfrentamiento *Trichoderma spp* cepa Pista 9/*F. oxysporum*.

Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

El cromatograma expuesto mostró los picos a 4,18min; 6,785 min; 10,39 min y 28,500 min correspondientes al medio PDA además del pico a los 4,595 min correspondiente al patógeno *F. oxysporum*. (Figura 54).

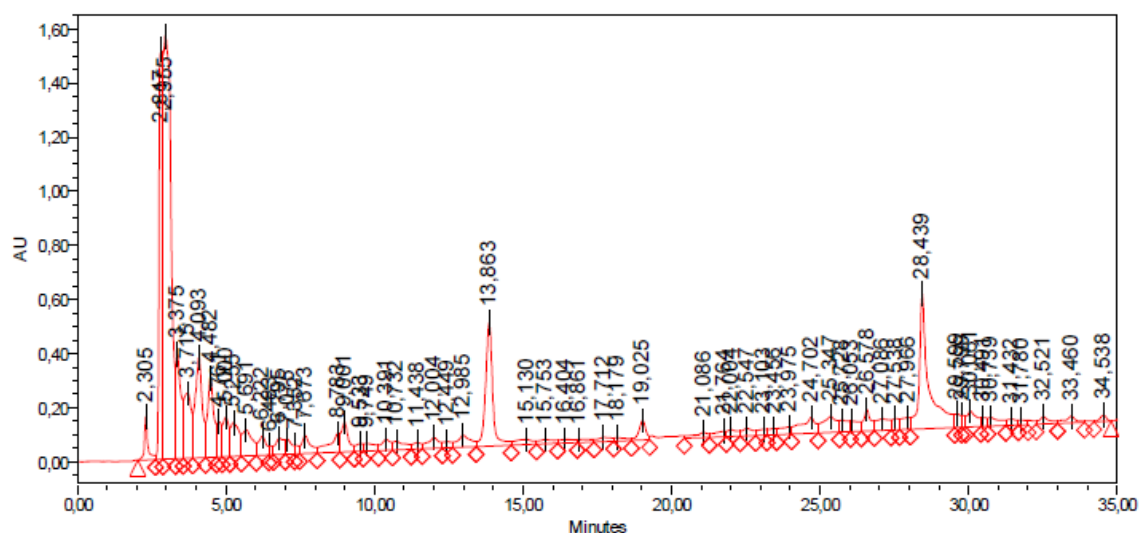


Figura 55: Cromatograma *T. afroharzianum* 3A3 in vitro. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm.

La figura 55 expone los picos a los 4,093 min y 28,439 min correspondientes al medio PDA y un pico a los 13,063 correspondientes a la cepa *Trichoderma spp* 3A3.

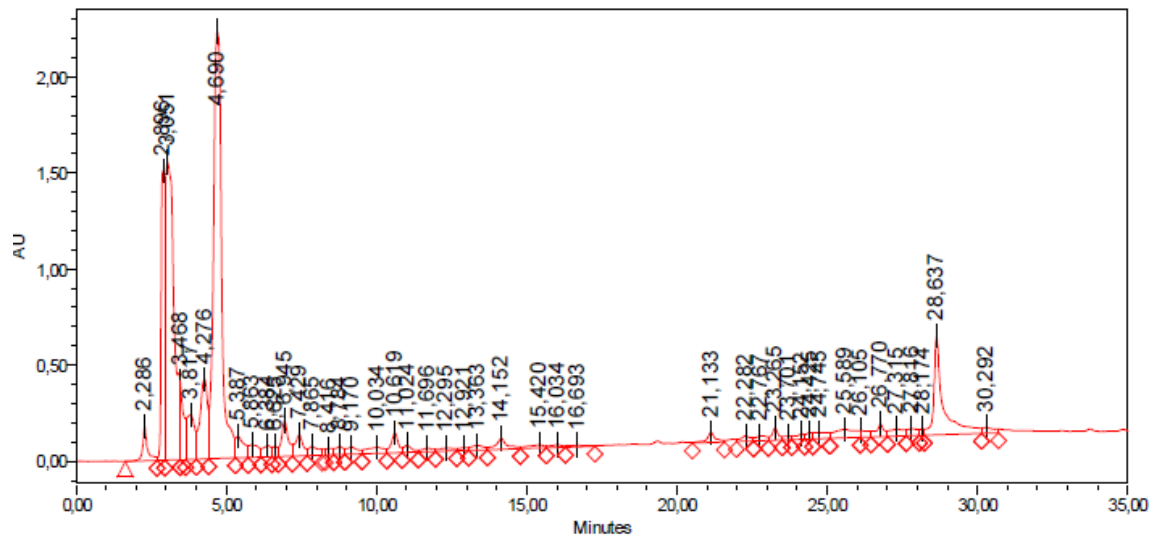


Figura 56: Cromatograma del enfrentamiento *T. afroharzianum* 3A3/*F. oxysporum*. Los análisis cromatográficos se realizaron mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando un sistema Altus A10 equipado con un detector de arreglo de con detección a 220nm

El cromatograma expuesto, muestra los picos a los 4,276 min, exclusivo del enfrentamiento de la cepa con el patógeno, un pico a los 4,69 min correspondiente al patógeno y un pico a los 28,637 min correspondiente al medio PDA. (Figura 56)

6.5. Protección en fruto con peptaiboles extraídos de cepas específicas.

Se realizó la aplicación del extracto total de peptaiboles obtenidos a partir del enfrentamiento entre la cepa *Trichoderma* spp Pista 9 de *Trichoderma* spp y *F. oxysporum* previo a la infección de los mismos tomates con el patógeno *B. cinerea*. Este procedimiento se utilizó para evaluar la capacidad de protección de la extracción ante el patógeno demostrando así el espectro de acción de estos metabolitos secundarios. Se eligió esta cepa de *Trichoderma* ya que fue la que mayor velocidad de crecimiento radial promedio presentó y es de gran importancia en el grupo de investigación. Se analizó mediante la aparición o no de síntomas de la enfermedad producida por *B.cinerea*, como también la aparición temprana o tardía de los mismos.

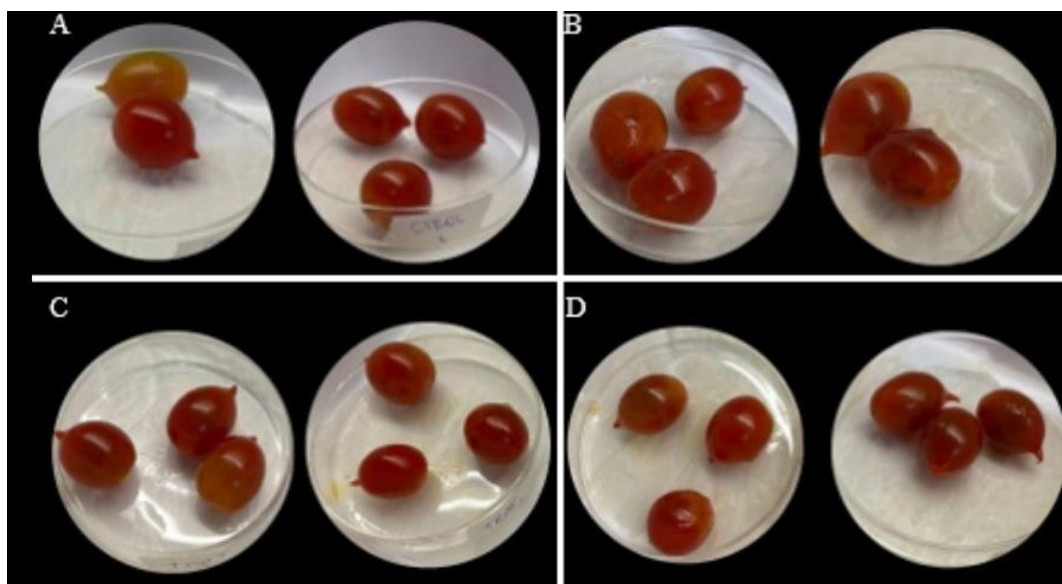


Figura 57: Ensayo de protección de frutos frente a *B. cinerea* con extractos totales de peptaiboles totales extraídos del enfrentamiento *Trichoderma* Pista 9-*F. oxysporum*. Fruto control negativo con aplicación 0.05% v/v Tween 20 y metanol(A), Fruto control de la infección *B. cinerea* (B). Tomates con extracto total de peptaiboles totales para análisis de protección por parte de los mismos. (C). Tomates con extracto total de peptaiboles e infección con patógeno *B. cinerea*. (D). Cada tratamiento se realizó por triplicado y se eligieron las fotos de la repetición más representativa.

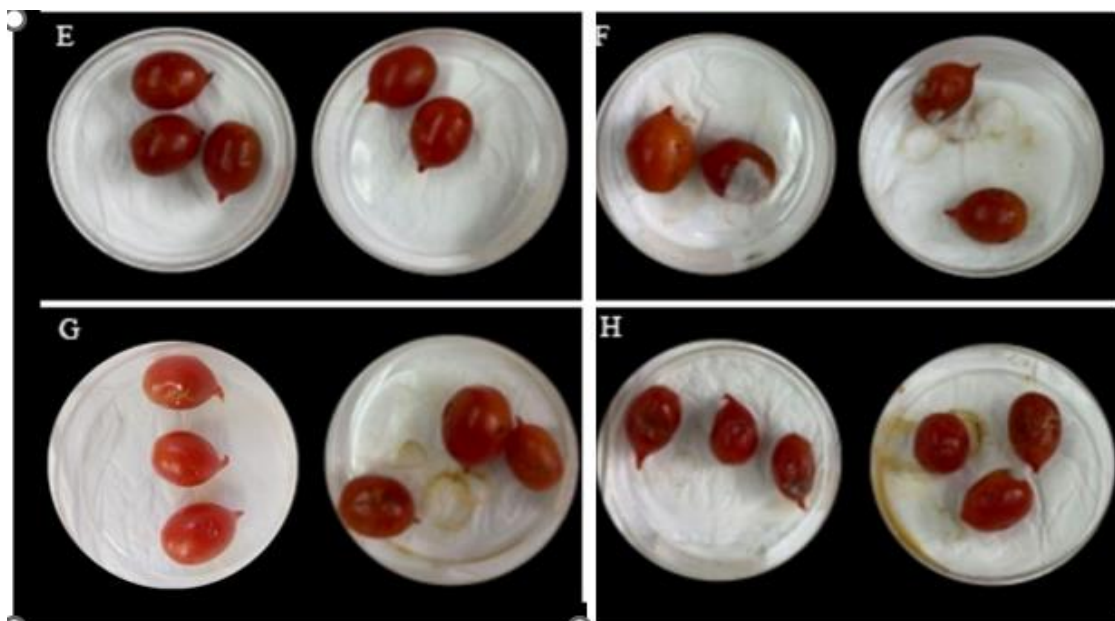


Figura 58: Ensayos de protección en fruto frente a *B. cinerea* con extracto total de peptaiboles totales extraídos del enfrentamiento *Trichoderma* spp Pista 9/F.oxysporum. Fruto control negativo con aplicación 0.05% v/v Tween20 y metanol, 3 días post aplicación de la solución control (A). Fruto control de la infección con *B. cinerea* 3 días post infección (B). Tomates 3 días post aplicación del extracto total de peptaiboles totales (C). Frutos con extracto total de peptaiboles e infección con patógeno *B. cinerea* 3 días post aplicación de ambos. (D). Cada tratamiento se realizó por triplicado y se eligieron las fotos de la repetición más representativa.

Se utilizó cinco unidades correspondientes al control positivo de infección con *B. cinerea* y cinco unidades tratadas con una solución de metanol y 0.05 % v/v Tween20 como control negativo. Posteriormente, se aplicó el extracto de peptaiboles a seis unidades de tomate Cherry, las cuales no fueron infectadas con el patógeno.

Finalmente, se realizó el tratamiento con el extracto total de peptaiboles totales seguido de la infección con *B. cinerea* en las seis unidades restantes.

En base a los controles de las imágenes se pueden observar las características de los tomates sanos, control 0.05% v/v Tween20 con metanol (A), los cuales con el paso de 3 días no presentan síntomas de enfermedad por parte del patógeno (E). En cambio, en la imagen F se observa que los frutos presentan características macroscópicas de infección por parte de *B. cinerea*, como la presencia de hifas grisáceas en las inserciones realizadas con bisturí las cuales no estaban presentes en la imagen B.

Por otro lado, en las imágenes C y G se observa que el extracto de peptaiboles aplicado, los tomates no presentan ningún síntoma de enfermedad, ni gran variancia en sus características macroscópicas (forma, tamaño y turgencia) frente al paso del tiempo post aplicación del extracto.

Por último, a partir de las imágenes D y H, comparándolas con las imágenes de los frutos sanos y con síntomas de infección, se podría considerar que aquellos que se les aplicó el extracto total de peptaiboles y luego una infección con el patógeno *B. cinerea* presentaron un cambio en su característica macroscópica de tamaño y turgencia, pero no presentarían síntomas de infección por parte del patógeno como las observadas en la imagen F.

Estos resultados podrían evidenciar que los peptaiboles totales obtenidos a partir del enfrentamiento de *Trichoderma Pista 9* y *F. oxysporum* presentan actividad de control biológico frente a *B. cinerea*, así como la capacidad de inducir mecanismos de resistencia en el fruto de tomate.

6. Discusión.

El tomate (*S. lycopersicum* L.) constituye uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial, con una producción que supera los 180 millones de toneladas anuales y una distribución prácticamente global (FAO, 2022; Zhang et al., 2025). Sin embargo, su producción se encuentra severamente afectada por enfermedades causadas por patógenos fúngicos, entre los que se destacan *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *A. alternata* (Sharma et al., 2023; Bawa et al., 2024).

En particular, *B. cinerea* genera pérdidas económicas significativas a nivel global (Dean et al., 2012; Fillinger & Elad, 2016), mientras que *F. oxysporum* puede ocasionar reducciones de hasta un 80% en el rendimiento (Zhang et al., 2023). Por su parte, *A. alternata* es uno de los principales agentes causales de pudrición de frutos tanto en pre como en postcosecha (Troncoso-Rojas & Tiznado-Hernández, 2014).

En este contexto, el presente estudio abordó el aislamiento y la caracterización macro y microscópica de cepas del género *Trichoderma*, su clasificación en función del

micoparasitismo observado frente a los tres patógenos mencionados, así como el análisis de los metabolitos secundarios producidos durante enfrentamientos duales *in vitro*. De este modo, se buscó evaluar el potencial de ocho cepas de *Trichoderma* como agentes de biocontrol y su posible espectro de acción frente a distintos fitopatógenos.

Se aislaron ocho cepas de *Trichoderma*: *T. afroharzianum* UEPAAR5, *Trichoderma* spp. 20NAR3, *T. afroharzianum* 10BR1, *T. afroharzianum* J66, *T. afroharzianum* J50, *T. afroharzianum* UEPAAR12, *Trichoderma* spp. Pista 9 y *T. afroharzianum* 3A3. Estas fueron caracterizadas a nivel macroscópico y microscópico, evidenciando similitudes y diferencias dentro del género. No obstante, es importante señalar que, para una caracterización macroscópica más precisa, las cepas deberían, complementarse con ensayos de mayor tiempo de incubación para la expresión de características fenotípicas a distintos tiempos

Los enfrentamientos duales *in vitro* evidenciaron la capacidad micoparasítica de las ocho cepas evaluadas. En todos los casos, frente a *B. cinerea* y *A. alternata*, las cepas fueron clasificadas como tipo 1, lo que indica que *Trichoderma* ocupó el 100% de la superficie de la placa de Petri, sobrecreciendo completamente al patógeno y evidenciando un micoparasitismo total.

En contraste, frente a *F. oxysporum*, las cepas *T. afroharzianum* UEPAAR5, *T. afroharzianum* J66, *Trichoderma* spp. 20NAR3 y *Trichoderma* spp. Pista 9 fueron clasificadas como tipo 2, alcanzando aproximadamente un 75% de ocupación de la placa. Este resultado indicó que, si bien *Trichoderma* logró sobrecrecer al patógeno, el micoparasitismo no fue completo, lo que sugiere una interacción más equilibrada entre ambos microorganismos en comparación con lo observado frente a los otros patógenos. En consecuencia, se decidió profundizar los estudios de los enfrentamientos duales *in vitro* de las cepas con el patógeno *F. oxysporum*.

En particular, la cepa *Trichoderma T. afroharzianum* UEPAAR5 presentó una disminución en su velocidad de crecimiento radial promedio de 1,18 cm/día (Tabla 4) en cultivo individual a 1,11 cm/día en enfrentamiento (Tabla 6), mientras que *F. oxysporum* incrementó su crecimiento de 0,51 cm/día (Tabla 5) a 0,75 cm/día (Tabla 6).

De manera similar, la cepa *Trichoderma* spp. 20NAR3 también redujo su velocidad de crecimiento en presencia del patógeno (Tabla 7), mientras que este último mantuvo valores similares a los observados en su control (Tabla 4). Por su parte, la cepa *T. afroharzianum* J66 disminuyó su velocidad de crecimiento radial promedio en 0,22 cm/día frente a *F. oxysporum*, el cuál nuevamente no evidenció variaciones en su crecimiento. (Tablas 4,5, y 9).

Este patrón sugiere que, durante la interacción, *Trichoderma* podría haber redirigido recursos metabólicos hacia mecanismos asociados al micoparasitismo, como la producción de enzimas hidrolíticas y metabolitos antifúngicos, lo que se traduciría en una reducción de su velocidad de crecimiento. En contraposición, el aumento o mantenimiento de la velocidad de crecimiento de *F. oxysporum* podría interpretarse como una respuesta competitiva frente a la presencia del antagonista.

En relación con la capacidad de micoparasitismo, todas las cepas evaluadas frente a *F. oxysporum* fueron clasificadas como clase 2, es decir, lograron sobrecrecer al patógeno cubriendo aproximadamente el 75% de la superficie de la placa. En este sentido, la disminución en la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* observada en los enfrentamientos podría haber influido en que el sobrecrecimiento no fuera total sino parcial (clase 2). No obstante, dado que el patógeno mantuvo o incrementó su velocidad de crecimiento en estas condiciones, es probable que la interacción entre ambos organismos haya generado una competencia más equilibrada, limitando la capacidad de colonización completa por parte del antagonista.

En conjunto, estos resultados sugieren que la velocidad de crecimiento radial no sería el único factor determinante del grado de micoparasitismo observado, sino que este podría depender de la compleja interacción entre ambos microorganismos, incluyendo la capacidad de respuesta del patógeno y la eficiencia de los mecanismos de biocontrol desplegados por *Trichoderma*. De igual forma se procedió a analizar los metabolitos secundarios producidos durante la interacción dual, para estudiar la presencia de los mismos y si es posible atribuir el micoparasitismo observado a la producción de peptaiboles por parte de las cepas de *Trichoderma*, además de estudiar su espectro de acción frente a los patógenos.

Se realizó un protocolo de extracción dirigido a peptaiboles a partir del halo de inhibición observado en los enfrentamientos duales, así como de los controles individuales de los patógenos y de las ocho cepas de *Trichoderma*. Las muestras obtenidas se les realizó un análisis por HPLC con detección a 220 nm, lo que permitió evidenciar la presencia de metabolitos secundarios, particularmente compuestos de naturaleza peptídica, dado que a esta longitud de onda absorben los enlaces peptídicos.

Si bien la detección a 220 nm presenta baja selectividad y no permite identificar de manera inequívoca los compuestos presentes, el uso de un protocolo de extracción específico para peptaiboles, en conjunto con el análisis de los cromatogramas, aporta información relevante. En este sentido, la aparición de picos exclusivos en los perfiles cromatográficos de los enfrentamientos duales, ausentes en los controles individuales, sugiere la inducción de metabolitos secundarios en respuesta a la interacción entre *Trichoderma* y el patógeno.

Por ejemplo, se pueden diferenciar picos exclusivos en los enfrentamientos de *T. afroharzianum* 3A3/ *F. oxysporum* a los 4,276min; el halo de inhibición de *T. afroharzianum* J50/*F. oxysporum* presentó dos picos exclusivos a los 8,668 y 13,989 min. El enfrentamiento dual *in vitro* de *Trichoderma* spp 20NAR3 frente al mismo patógeno presentó picos en los 4,269min; 5,991min y 14,092min. En cambio, la cepa *T. afroharzianum* J66 presentó un pico a los 4,707 min. Por último, las cepas *T. afroharzianum* UEPAAR12 presentaron señal a los 5.576 min y a los 8,756 min, y *T. afroharzianum* 10BR1 a los 14,242min; 17,752min y 18,721 min. Estas señales fueron distintivas de los enfrentamientos realizados, dado que fueron comparados con los controles de las cepas individuales, de los patógenos individuales y del control del medio PDA, igualmente este último puede generar señales debido a la degradación de sus compuestos por parte de los microorganismos.

Si bien se observaron estas señales exclusivas hay enfrentamientos los cuales sus cromatogramas no dieron ningún tipo de señal como *T. afroharzianum* UEPAAR 5/*F.oxysporum*, y *T. afroharzianum* UEPAAR12, lo que indica que bajo estas condiciones evaluadas no habría presencia de metabolitos que absorban a 220nm, lo que no indica ausencia de metabolitos secundarios a otras longitudes, por lo que debería realizarse mediciones a distintas longitudes de onda.

Considerando que la metodología de extracción se orientó específicamente a la recuperación de peptaiboles, es posible inferir que estos compuestos podrían estar involucrados en la actividad de biocontrol observada. No obstante, dado el carácter no específico de la detección y la complejidad de los metabolitos producidos por *Trichoderma*, estos resultados deben interpretarse con cautela. En consecuencia, se requerirían estudios adicionales, como análisis por espectrometría de masas para confirmar la identidad de los compuestos detectados y establecer de manera concluyente su rol en los mecanismos de biocontrol.

En el caso de *Trichoderma spp* Pista 9, el análisis cromatográfico no evidenció la presencia de picos exclusivos asociados al enfrentamiento dual, observándose únicamente señales coincidentes con el control del patógeno (*F. oxysporum*) y del medio de cultivo PDA. La ausencia de señales diferenciales atribuibles a metabolitos producidos por *Trichoderma* durante la interacción podría deberse a diversas causas, tales como limitaciones en la sensibilidad del método variaciones en la producción de metabolitos bajo las condiciones evaluadas. Respaldando que debería realizarse la cromatografía a distintas longitudes de onda.

En este contexto, y con el objetivo de no descartar la capacidad de producción de metabolitos secundarios por parte de esta cepa, se decidió conservar y utilizar los extractos obtenidos para su posterior evaluación en ensayos sobre fruto. Esta aproximación permitirá analizar la posible actividad biológica de los compuestos presentes, así como corroborar la existencia de metabolitos con potencial biocontrolador que no hayan sido detectados mediante el análisis cromatográfico realizado.

Al utilizar el extracto de peptaiboles totales del enfrentamiento dual *Trichoderma spp* Pista 9/*F.oxysporum* en frutos de tomates frente a la infección con *B. cinerea* se analizó el espectro de acción de estos metabolitos secundarios en conjunto con la presencia de los mismos debido a la falta de señal observada en el cromatograma de la extracción.

Se observó que aquellos frutos que se les aplicó la extracción presentaron mantención de propiedades macroscópicas frente al tiempo, como turgencia y coloración. Esto se concluyó al comparar los frutos a los que se le aplicaron peptaiboles

totales frente a los controles con Tween20. Por otro lado, se observó que aquellos frutos que se les aplicó la extracción de peptaiboles y luego se infectaron con el patógeno *B. cinerea* presentaron mayor protección frente al mismo sostenida en el tiempo en comparación con aquellas que fueron infectados con el patógeno sin la aplicación previa del extracto total.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el extracto derivado del enfrentamiento dual de *Trichoderma* spp. Pista 9 y *F. oxysporum* presentó actividad biológica capaz de conferir protección a los frutos de tomate frente a la infección con *B. cinerea*, evidenciada por la conservación de sus características macroscópicas y la reducción del desarrollo de la enfermedad. Si bien el análisis cromatográfico no permitió detectar picos exclusivos asociados a metabolitos producidos durante la interacción, el hecho de que el protocolo de extracción se haya orientado específicamente a la recuperación de peptaiboles permite plantear que estos compuestos podrían estar involucrados en el efecto biocontrolador observado. No obstante, debido a las limitaciones analíticas mencionadas y a la complejidad del metaboloma de *Trichoderma*, no es posible confirmar de manera concluyente su presencia ni su rol específico. En este sentido, los resultados obtenidos constituyen una evidencia indirecta que respalda el potencial de estos metabolitos, siendo necesario profundizar mediante técnicas analíticas más específicas y estudios complementarios que permitan identificar y caracterizar los compuestos involucrados, así como dilucidar su mecanismo de acción.

7. Conclusiones.

En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron ocho cepas del género *Trichoderma*, tanto a nivel macroscópico como microscópico, lo que permitió evidenciar similitudes y diferencias dentro del género. Si bien la caracterización macroscópica podría haberse optimizado mediante tiempos de incubación más prolongados, los resultados obtenidos fueron suficientes para confirmar la identidad de las cepas y avanzar en su evaluación como potenciales agentes de biocontrol.

Los ensayos de enfrentamiento dual *in vitro* demostraron que todas las cepas presentaron capacidad micoparasítica frente a los patógenos evaluados. En particular, se

observó un sobrecrecimiento total (clase 1) frente a *B. cinerea* y *A. alternata*, lo que evidenció una alta capacidad antagonista. En contraste, frente a *F. oxysporum* algunas cepas mostraron un comportamiento de clase 2, alcanzando un sobrecrecimiento parcial, lo que indicó una interacción más equilibrada entre ambos microorganismos.

El análisis de la velocidad de crecimiento radial permitió profundizar en la dinámica de estas interacciones, observándose que, en presencia del patógeno, varias cepas de *Trichoderma* disminuyeron su crecimiento, mientras que *F. oxysporum* tendió a mantenerlo o incrementarlo. Estos resultados sugirieron que la velocidad de crecimiento no fue el único factor determinante del micoparasitismo, sino que intervinieron mecanismos más complejos asociados a la competencia y a la activación de respuestas metabólicas específicas.

En cuanto a los ensayos realizados en frutos de tomate, se observó que la aplicación de extractos obtenidos de los enfrentamientos duales permitió conservar las propiedades macroscópicas de los frutos y reducir el desarrollo de la enfermedad causada por *B. cinerea*. Estos resultados evidenciaron un efecto protector de los compuestos presentes en los extractos.

El análisis de los metabolitos secundarios mediante HPLC a 220 nm mostró perfiles variables entre las muestras, detectándose en algunos casos picos exclusivos en los enfrentamientos duales, lo que sugirió la inducción de compuestos en respuesta a la interacción con el patógeno. No obstante, la baja especificidad de la longitud de onda utilizada impidió identificar de manera concluyente la naturaleza de dichos metabolitos.

Considerando que el protocolo de extracción se orientó a la obtención de peptaiboles, y en conjunto con la evidencia indirecta obtenida a partir de los cromatogramas y los ensayos biológicos, se plantea que estos compuestos podrían estar involucrados en la actividad antifúngica observada. Sin embargo, no fue posible confirmar su identidad de manera definitiva, por lo que se requieren estudios complementarios, como análisis por espectrometría de masas, que permitan su caracterización y la elucidación de sus mecanismos de acción.

Finalmente, los ensayos en fruto demostraron que los extractos presentaron actividad biológica incluso en aquellos casos donde no se detectaron señales cromatográficas exclusivas, lo que sugiere un posible amplio espectro de acción de los metabolitos producidos por *Trichoderma*. En conjunto, los resultados obtenidos evidenciaron el potencial de estas cepas como agentes de biocontrol frente a patógenos del tomate, posiblemente asociado a la producción de metabolitos secundarios, aunque su naturaleza específica y su modo de acción deberán ser profundizados en futuros estudios.

8. Bibliografía

- Alfiky, A., & Weisskopf, L. (2021). Deciphering Trichoderma–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi*, 7(1), 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>.
- Andersson, D. I., & Levin, B. R. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 489-493. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00005-3).
- Aydemir, G., Kasiri, Y., & Birta, E. (2013). Lycopene and tomato products as potential antioxidant sources. *Journal of Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12042>.
- Badalyan, S. M., Innocenti, G., & Garibyan, N. G. (2004). *Interactions between xylophilic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 44–48. doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1733
- Barnett, H. L., y Hunter, B. B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi* (3.^a ed.). Burgess Publishing Company.
- Bawa, I., Kumar, S., & Singh, R. (2024). Fungal diseases of tomato and their management strategies. *Journal of Plant Pathology*, 106(1), 15–28.
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (2007). Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1604-3>.
- Brückner, H., & Przybylski, M. (1984). Isolation and structural characterization of peptaibols from *Trichoderma viride*. *Journal of Chromatography A*, 296, 263–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)84321-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)84321-9).
- Calumby, R. J. N., Santone, A., Butassi, E., Svetaz, L. A., Melhem, M. d. S. C., Rius, S. P., & Campos-Bermudez, V. A. (2025). Exploring the bioactive secondary metabolites of two Argentine *Trichoderma afroharzianum* strains. *Journal of Fungi*, 11(6), 457. <https://doi.org/10.3390/jof11060457>
- Cardona-Piedrahita, L. F., & Castaño-Zapata, J. (2019). *Comparación de métodos de inoculación de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder & Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(167), 227–233. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.854>
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W. M., Gazis, R. O., Degenkolb, T., y Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Fungal Diversity*, 80, 1–37. <https://doi.org/10.1007/s13225-015-0319-8>

- Chugh, J. K., & Wallace, B. A. (2001). Peptaibols: Models for ion channels. *Biochemical Society Transactions*, 29(4), 565–570. <https://doi.org/10.1042/BST0290565>.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B., & Gräfe, U. (2003). The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *Journal of Peptide Science*, 9(11), 666–678. <https://doi.org/10.1002/psc.496>.
- Degenkolb, T., Kirschbaum, J., & Brückner, H. (2007). New sequences, structures and biological activities of peptaibiotics. *Chemistry & Biodiversity*, 4(5), 1052–1067. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790091>.
- Degenkolb, T., Dieckmann, R., Nielsen, K. F., Gräfenhan, T., Theis, C., Zafari, D., Chaverri, P., Ismaiel, A., Brückner, H., Von Döhren, H., Thrane, U., & Samuels, G. J. (2008). The *Trichoderma brevicompactum* clade: A separate lineage with new species, new peptaibiotics and mycotoxins. *Mycological Progress*, 7, 177–219. <https://doi.org/10.1007/s11557-008-0563-3>.
- Deising, H. B., Reimann, S., & Pascholati, S. F. (2008). Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 286–295. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200017>.
- Dou, K., Gao, J., Zhang, C., Yang, H., Jiang, X., Li, J., Li, Y., Wang, W., Xian, H., & Li, S. (2019). *Trichoderma* biodiversity in major ecological systems of China. *Journal of Microbiology*, 57(8), 668–675. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8357-7>
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń-Zelazowska, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2006). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(10), 813–828. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.06.007>.
- Engelberth, J., Koch, T., Schüler, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J., & Boland, W. (2000). Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of plant defence responses. *The Plant Journal*, 21(6), 599–611. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00712.x>.
- FAO. (2022). *FAOSTAT statistical database*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/>
- Fillinger, S., & Elad, Y. (Eds.). (2016). *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer.

- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., & Gurr, S. J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360(6390), 739-742. <https://doi.org/10.1126/science.aap7999>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2006). *FAOSTAT statistical database*. <http://faostat.fao.org/default.aspx>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). *FAOSTAT statistical database*. <https://www.fao.org/faostat/>
- George, B., Kaur, C., Khurdiya, D. S., & Kapoor, H. C. (2004). Antioxidants in tomato (*Solanum lycopersicum*) as a function of genotype. *Food Chemistry*, 84, 45–51.
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A., & Lommel, S. A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant–pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(8), 1015–1026. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1015>.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>.
- Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2018). Predicting resistance by mutagenesis: lessons from 45 years of fungicide research. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00030>.
- Kubicek, C. P., Komoń-Zelazowska, M., Druzhinina, I. S., & Bissett, J. (2008). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 90(3), 495–507. <https://doi.org/10.4454/jpp.v90i3.637>.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badan, R., Challacombe, J., Chertkov, O., Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral lifestyle of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12, R40. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>.
- Kretschmer, M., Lerach, M., Mosbach, A., Walker, A.-S., Fillinger, S., & Mernke, D. (2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.100069>
- Laboratorio de Micología Veterinaria. (s. f.). *Medio Lactrimel (de Borelli): Instructivo de preparación* (Versión 00). Escuela de Enfermedades Infecciosas.
- Lacaz, C. S., Porto, E., Martins, J. E. C., Heins-Vaccari, E. M., & Melo, N. T. (Eds.). (2002). *Tratado de micología médica*. São Paulo: Sarvier.

- León-García, E., Del Ángel Coronel, O. A., Vela-Gutiérrez, G., De la Cruz Medina, J., & García, H. S. (2017). *Tomato (Solanum lycopersicum)*. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/53698807/Solanum_lycopersicum_Tomato.pdf
- Li, M.-F., Li, G.-H., & Zhang, K.-Q. (2019). Non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. *Metabolites*, 9(3), 58. <https://doi.org/10.3390/metabo9030058>.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: From ‘omics’ to the field. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 395–417. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114314>.
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The evolution of fungicide resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 90, 29–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.00>.
- Marik, T., Urbán, P., Tyagi, C., Szekeres, A., Leitgeb, B., Vágvolgyi, C., & Kredics, L. (2019). Diversity and bioactivities of peptaibols produced by *Trichoderma* species. *Biomolecules*, 9(8), 344. <https://doi.org/10.3390/biom9080344>.
- Melnyk, A. H., Wong, A., & Kassen, R. (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evolutionary Applications*, 8, 273–283. <https://doi.org/10.1111/eva.12196>.
- Moghadasian, M., Hoseini, B., Ebrahimzadeh, M. A., & Rouhani, H. (2023). *Trichoderma asperellum* empowers tomato plants and suppresses *Fusarium oxysporum* through priming responses. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1140378>
- Molla, A. H., Fakhru'l-Razi, A., Abd-Aziz, S., Hanafi, M. M., & Alam, M. Z. (2001). In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 849–856. doi.org/10.1023/A:1013844306960
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 749–759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>
- Naik, G. R., & Bisen, P. S. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity—A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1315–1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
- Palozza, P., Simone, R., Catalano, A., & Mele, M. C. (2011). Lycopene and tomato products in health and disease: An overview of the recent literature. *Current Medicinal Chemistry*, 18(8), 1146–1163. <https://doi.org/10.2174/092986711794940990>.

- Parveen G, Ansari WA, Kumar N and Jaiswal DK (2026) Harnessing secondary metabolites of endophytic microbes: a next-generation biopesticide for crop disease management. *Front. Microbiol.* 16:1705702. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1705702>.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (3rd ed.). Springer.
- Rahimi Tamandegani, P., Marik, T., Zafari, D., Balázs, D., Vágvyölyi, C., Szekeres, A., & Kredics, L. (2020). Changes in peptaibol production of *Trichoderma* species during *in vitro* antagonistic interactions with fungal plant pathogens. *Biomolecules*, 10(5), 730. <https://doi.org/10.3390/biom10050730>.
- Rao, A. V., & Agarwal, S. (2000). Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(5), 563–569. <https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718953>.
- Riddell, R. W. (1950). Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, 42(2), 265–270. <https://doi.org/10.1080/00275514.1950.12017890>.
- Rossman, A. Y., Samuels, G. J., Rogerson, C. T., & Lowen, R. (1999). Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales). *Studies in Mycology*, 42, 1–248. [https://doi.org/10.1016/S0166-0616\(14\)70453-7](https://doi.org/10.1016/S0166-0616(14)70453-7).
- Santone, A. (2020). *Aislamiento e identificación de biocontroladores autóctonos de cepas fitopatógenas* (Tesis doctoral en Ciencias Biológicas). Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina. Directora: Dra. Valeria A. Campos Bermudez, Co-directora: Dra. Claudia P. Spampinato.
- Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics in the mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4364–4370. <https://doi.org/10.1128/AEM.60.12.4364-4370.1994>.
- Sehim, A. E., Hewedy, O. A., Altammar, K. A., Alhumaidi, M. S., & Abd Elghaffar, R. Y. (2023). *Trichoderma asperellum* empowers tomato plants and suppresses *Fusarium oxysporum* through priming responses. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1140378. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1140378>.
- Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martínez, P., Sun, J., Grigoriev, I., Herrera-Estrella, A., Baker, S. E., & Kubicek, C. P. (2009). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics*, 10, 567. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-567>.
- Sharma, P., Kaur, H., & Singh, G. (2023). Major diseases of tomato and their impact on yield. *Agronomy*, 13(5), 1200.
- Shi, M., Chen, L., Wang, X. W., Zhang, T., Zhao, P. B., Song, X. Y., Sun, C. Y., & Chen, X. L. (2012). Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii*.

Applied Microbiology and Biotechnology, 94, 165–176. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3633-1>.

- Singh, M., Prasanna, H. C., et al. (2016). *Biology of Solanum lycopersicum (Tomato)*. Ministry of Environment, Forest and Climate Change, Government of India. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0003686>
- Story, E. N., Kopec, R. E., Schwartz, S. J., & Harris, G. K. (2010). An update on the health effects of tomato lycopene. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 189–210. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124120>.
- Trejo-Solís, C., Pedraza-Chaverri, J., Torres-Ramos, M., Jiménez-Farfán, D., Cruz-Salinas, A., Santillán-Benítez, J. G., & Sotelo, J. (2013). Multiple molecular and cellular mechanisms of action of lycopene in cancer inhibition. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2013/705121>.
- Troncoso-Rojas, R., & Tiznado-Hernández, M. E. (2014). *Alternaria alternata* (black rot, black spot). En S. Bautista-Baños (Ed.), *Postharvest decay* (pp. 147–187). Academic Press.
- Vargas-Inciarte, L., Fuenmayor-Arrieta, Y., Luzardo-Méndez, M., Da Costa-Jardin, M., Vera, A., Carmona, D., ... & San-Blas, E. (2019). Use of different *Trichoderma* species in cherry-type tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) against *Fusarium oxysporum* wilt in tropical greenhouses. *Agronomía Costarricense*, 43(1). <https://doi.org/10.15517/rac.v43i1.35671>.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>.
- Vinale, F., Strakowska, J., Mazzei, P., Piccolo, A., Marra, R., Lombardi, N., Manganiello, G., Pascale, A., Woo, S. L., & Lorito, M. (2016). Cremenolide, a new antifungal 10-member lactone from *Trichoderma cremeum*. *Natural Product Research*, 30(22), 2575–2581. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1131985>.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L., & Chet, I. (2007). Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth–promoting agent *Trichoderma asperellum*. *Microbiology*, 153, 113–121. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/001974-0>.
- Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B. W., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbolle, D. J., Bodo, B., & Kenerley, C. (2002). Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20862–20868. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201858200>.
- Yang, L.-N., He, M.-H., Ouyang, H.-B., Zhu, W., Pan, Z.-C., Sui, Q.-J., Wang, F., & Zhan, J. (2019). Cross-resistance to DMI fungicides in *Alternaria alternata*. *BMC Microbiology*, 19, 210. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1574-8>.

- Zhang, X., Liu, Y., & Chen, Z. (2023). Insights into Fusarium wilt of tomato and its management. *Microorganisms*, 11(2), 263. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020263>
- Zhang, Y., Wang, Q., & Li, J. (2025). Induced resistance in tomato against fungal pathogens. *Frontiers in Plant Science*
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in *Trichoderma*—Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30, 74-90. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>.
- Zhou, C., Guo, R., Ji, S., Fan, H., Wang, J., Wang, Y., & Liu, Z. (2020). Isolation of *Trichoderma* from forestry model base and the antifungal properties of isolate TpsT17 toward *Fusarium oxysporum*. *Microbiological Research*, 231, 126371. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126371>