

Evaluación de dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. como biocontroladoras y promotoras del crecimiento vegetal



Tesis de Grado - Licenciatura en Ciencias Biológicas
Laboratorio de Biología Molecular Vegetal
Empresa Khyma

Carlos Rodrigo Diana Leporace

Tutora: Dra. Alexandra Castro
Co-tutor: Ing. Agr. Joaquín Garrido

Montevideo
Mayo 2023

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que han sido parte de este increíble viaje de investigación y aprendizaje:

A mi tutora, Dra. Alexandra Castro, por su constante apoyo, humildad, dedicación y trabajo, a lo largo de estos años. No solo me ha brindado orientación académica, sino que también ha demostrado una actitud positiva y alentadora en los momentos difíciles. Admiro y respeto profundamente tu labor científica y humana.

A todas las enormes científicas que integran el laboratorio de Biología Molecular Vegetal. Su actitud positiva y compromiso con la ciencia han sido una inspiración constante para mí.

A Sabina Vidal, por permitirme realizar mi investigación en su laboratorio y por brindarme su experiencia y orientación.

A todos los docentes que han contribuido a mi formación académica.

A la Universidad de la República, por brindar una educación de primer nivel y por el esfuerzo de todos los actores involucrados. Agradezco el acceso a recursos y oportunidades que han enriquecido mi formación académica y personal.

A la empresa Khyma por el constante apoyo y la confianza del día a día.

A mi madre, mi principal referente y pilar fundamental, no existen palabras suficientes para expresar mi gratitud a tu apoyo constante y amor permanente. Gracias por ser mi inspiración y por estar siempre presente.

A mi hermana por su constante compañía y consejo.

A mi amada compañera de viaje, madre de mis hijos, te agradezco por todo el amor y apoyo que me brindas. Tu presencia ha sido un regalo invaluable en mi vida. Gracias por ser mi compañera y por el amor que compartimos.

A mi padre, por todas las enseñanzas y el amor incondicional durante los 15 hermosos años que compartimos juntos. Tus palabras de sabiduría y apoyo han sido un faro en mi vida.

A mi hermano "el Pocho", mi amigo de todas las horas. Gracias por esos momentos inolvidables mientras compartimos el camino.

A todo el grupo hermoso de amigos que he formado a lo largo de mi carrera, compuesto por personas increíbles, que han sido artífices de un sin fin de anécdotas inolvidables.

Índice

Índice	3
Lista de abreviaciones	5
Resumen	6
Introducción	7
Bioinsumos: una opción integral para el control de enfermedades y el crecimiento de las plantas.....	7
<i>Trichoderma</i> spp. como agente de control biológico y promotor del crecimiento	8
Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp.....	9
a) competencia	10
b) micoparasitismo.....	11
c) antibiosis.....	11
d) promoción del crecimiento	12
e) inducción de la defensa vegetal	12
Antecedentes del proyecto.....	13
Objetivos	15
Objetivo General	15
Objetivos específicos	15
Materiales y Métodos	16
Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.....	16
Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	16
Identificación molecular de <i>Trichoderma</i>	16
Cultivos duales	17
Ensayo de metabolitos volátiles.....	18
Ensayo de metabolitos difusibles.....	18
Efecto de <i>Trichoderma</i> en la arquitectura de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
Efecto de <i>Trichoderma</i> en la acumulación y transporte de auxinas utilizando líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
Resultados y discusión	20
Identificación morfológica	20
Identificación molecular de <i>Trichoderma</i> sp.....	20
Control biológico.....	22
a) enfrentamientos	22
b) antibiosis.....	25

Interacción con plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
a) Efecto morfológico	26
b) Arquitectura de la raíz y respuesta a auxinas.....	28
Conclusiones	30
Perspectivas	31
Anexo	32
Bibliografía	33

Lista de abreviaciones

ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MIP	Manejo integrado de plagas
SAR	Resistencia sistémica adquirida
ISR	Resistencia sistémica inducida
MGAP	Ministerio de ganadería agricultura y pesca
PICR	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial
PDA	Agar papa dextrosa
°C	Grados Celsius
6PP	6-pentil- α -pirona
ng	Nanogramo
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
cm	Centímetro
μ m	Micrómetro

Resumen

El aumento de la población humana ha generado una mayor demanda de alimentos, lo que pone presión en los sistemas agrícolas. El uso excesivo de fungicidas químicos ha sido una respuesta común a las enfermedades producidas por hongos en los cultivos, pero esto ha tenido consecuencias negativas a largo plazo. El control biológico surge como una alternativa sostenible, y respetuosa con el medio ambiente, utilizando microorganismos benéficos para inhibir el crecimiento de patógenos y promover el crecimiento vegetal. En este contexto, *Trichoderma* es un género especialmente interesante debido a su capacidad para combinar múltiples estrategias de biocontrol. En este estudio se evaluaron dos cepas nativas de *Trichoderma* spp. (C1 y M2) en su capacidad biocontroladora y promoción del crecimiento vegetal. El análisis molecular demostró que la cepa C1 potencialmente pertenece a la especie *Trichoderma atroviride*, y si bien mostró capacidad antagónica en cultivos duales, no provocó inhibición en los patógenos por metabolitos difusibles ni volátiles. La cepa M2 se destacó por su capacidad para producir metabolitos hidrosolubles que inhibieron el crecimiento de varios patógenos, especialmente *S. rolfsii*. Estos resultados respaldan trabajos previos sobre los mecanismos de acción de *Trichoderma* en el control de patógenos fúngicos. Se realizaron co-cultivos de las cepas con plantas de *Arabidopsis thaliana* para estudiar su efecto en la morfología y respuesta de las plantas. Ambas cepas mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de las plantas, con una disminución en el peso fresco y la formación de raíces laterales. Además, se observó una alteración en la arquitectura de la raíz principal y una estimulación del crecimiento de los pelos radiculares. Sin embargo, no se observó un aumento en la expresión de genes inducidos por auxinas en las plantas tratadas. Se plantea la hipótesis de que los metabolitos volátiles producidos por las cepas podrían estar involucrados en el efecto inhibitorio en las plantas, y que la acidificación del medio causada por *Trichoderma* puede ser un factor clave en la inhibición del crecimiento vegetal. En conclusión, las cepas nativas de *Trichoderma* spp., especialmente la cepa M2, mostraron un potencial prometedor como agentes de control biológico. Sin embargo, se requieren más investigaciones para comprender los mecanismos involucrados y optimizar su aplicación en cultivos agrícolas.

Introducción

La creciente demanda de alimentos, debido al aumento de la población humana, ha generado una mayor presión sobre los sistemas productivos agrícolas. En este contexto, todos los cultivos enfrentan diversos niveles de exposición a enfermedades producidas por microorganismos, siendo los hongos fitopatógenos particularmente problemáticos (Fisher et al., 2012). Esto se debe a que los hongos pueden causar enfermedades catastróficas en las plantas por múltiples razones. En primer lugar, producen esporas en grandes cantidades que pueden infectar fácilmente a otras plantas. Además, su período latente es corto, lo que significa que pueden producir propágulos infecciosos poco después de la infección. Las esporas pueden ser transportadas por el viento o el agua, lo que aumenta su capacidad de infectar. Los hongos también pueden producir compuestos tóxicos y enzimas que destruyen la estructura de la planta, así como extraer nutrientes importantes de la misma, lo que puede disminuir los rendimientos de los cultivos (Strange et al., 2005).

Dentro de las distintas estrategias convencionales para reducir el impacto de las enfermedades en los cultivos, se encuentra el desarrollo de variedades resistentes, prácticas culturales y la aplicación de fungicidas químicos (Khan et al., 2020). Se debe tener en cuenta que los hongos patógenos evolucionan, por lo que los procesos de mejoramiento hacia variedades resistentes suelen quedar obsoletos si no son continuos. Además, las prácticas culturales no pueden abarcar la totalidad de las enfermedades, por lo que siguen apareciendo focos que perjudican notoriamente el rendimiento de los cultivos. En muchos casos, el enfoque que se le da al tratamiento de estos focos está asociado a la respuesta inmediata de los fungicidas químicos de amplio espectro. Si bien en muchos casos, ofrecen una solución rápida al atender el foco de enfermedad (Guzmán-Guzmán et al., 2023), suelen acelerar la aparición de patógenos resistentes ante un uso prolongado y representan un alto impacto en el medio ambiente y la salud humana (Rather et al., 2017; Tilman et al., 1999).

Bioinsumos: una opción integral para el control de enfermedades y el crecimiento de las plantas

A partir de la década de 1970, surgieron empresas enfocadas en la producción y comercialización de nuevos productos para la agricultura con un menor impacto ambiental. El interés en los bioinsumos ha ido en aumento debido a la creciente preocupación por los efectos negativos de los productos químicos sintéticos en la salud humana y el medio ambiente, así como la demanda de productos agrícolas más naturales y sostenibles.

El uso de bioinsumos en la agricultura puede ayudar a mejorar la calidad y rendimiento de los cultivos, reducir la dependencia de productos químicos sintéticos, disminuir los costos de producción y reducir el impacto ambiental. Los microorganismos contenidos en los bioinsumos pueden ayudar a fijar nutrientes en el suelo, mejorar la estructura del suelo, estimular el crecimiento de las raíces y proteger contra enfermedades y plagas. Además, el uso de bioinsumos puede mejorar la calidad de los alimentos, ya que los productos químicos sintéticos utilizados en la agricultura convencional pueden dejar residuos en los cultivos que

pueden ser perjudiciales para la salud humana. Los bioinsumos, al ser productos naturales, no suelen dejar residuos dañinos en los alimentos y son seguros para el consumo humano.

El manejo integrado de plagas (MIP) desempeña un papel fundamental en la protección de las plantas al limitar el uso de agentes químicos solo a los casos en que sea sumamente necesario. Se trata de un enfoque que combate las plagas y los patógenos mediante una combinación de métodos sostenibles, lo que reduce la dependencia de los pesticidas sintéticos. A diferencia de los pesticidas, el objetivo del MIP no es erradicar las plagas, sino manejarlas en cantidades bajas por debajo de los niveles económicamente perjudiciales (Green et al., 2020).

En este contexto, el control biológico surge como un método para manejar enfermedades en las plantas al inhibir el crecimiento de los patógenos, mejorar la inmunidad vegetal y modificar el ambiente mediante la utilización de microorganismos benéficos, compuestos o sistemas de cultivo saludables. Este enfoque, enmarcado en el MIP, presenta diversas ventajas respecto a otros métodos, ya que los agentes de control biológico se enfocan en grupos específicos de patógenos, lo que reduce el impacto negativo en el ecosistema en comparación con fungicidas. Además, muchos agentes de biocontrol pueden sostenerse por sí mismos y mantenerse durante más tiempo sin esfuerzos adicionales. También hay una compensación entre la resistencia del huésped y las características agronómicas, ya que se evita la constante expresión del sistema inmunitario del huésped, lo que permite que las plantas asignen más energía y recursos a características importantes para los agricultores (He et al., 2021).

Es importante destacar que el control biológico es una técnica antigua que se ha desarrollado desde el siglo XIX, y que se define como “la acción de parásitos, depredadores o patógenos para mantener la densidad de población de otro organismo en un promedio inferior al que ocurriría en su ausencia” (DeBach y Rosen., 1991). Los agentes de control biológico se dividen en tres categorías: supresión de patógenos, inducción de resistencia en la planta y mejora de la calidad del suelo. La categoría de supresión de patógenos es la más investigada y se realiza mediante la liberación de organismos que producen antibióticos para matar patógenos, parasitarlos, depredarlos o competir por nutrientes. Los endófitos bacterianos y fúngicos producen metabolitos secundarios que aplazan los patógenos de las plantas. La inducción de resistencia en la planta y la mejora de la calidad del suelo también involucran el uso de microorganismos beneficiosos. En consecuencia, el control biológico se convierte en una estrategia importante y existen diversos agentes de biocontrol disponibles en cada categoría para su uso en diferentes situaciones (He et al., 2021).

***Trichoderma* spp. como agente de control biológico y promotor del crecimiento**

Dentro de los agentes de biocontrol fúngicos, el género *Trichoderma* es especialmente atractivo debido a su capacidad para combinar varios aspectos del biocontrol en un solo microorganismo. Estos incluyen el antagonismo directo de una amplia gama de hongos fitopatógenos, la promoción del crecimiento vegetal, la producción de metabolitos bioactivos

tanto volátiles como difusibles, la competencia por el nicho que representa la rizósfera, así como la expresión de genes de defensa en la planta huésped (Guzmán-Guzmán et al., 2023). Además, *Trichoderma* spp. ataca las hifas de diversos hongos, así como también puede penetrar y destruir estructuras en reposo, reduciendo su potencial de inóculo en el suelo. Algunos patógenos del suelo pueden producir esclerocios, estructuras altamente resistentes a la degradación con agentes químicos y que sobreviven en ausencia de un huésped. No obstante, se ha demostrado que algunas especies de *Trichoderma* pueden parasitar agresivamente los esclerocios a través de técnicas de microscopía, como se indica en el estudio de Sarrocco et al., 2006.

Trichoderma sp. es un hongo ascomiceto filamentoso, cosmopolita, que posee un amplio rango de huéspedes y ataca a hongos con composiciones de superficie celular diferentes (Rocha-Ramírez et al., 2002). Este hongo presenta mecanismos directos e indirectos para antagonizar a los hongos fitopatógenos. Entre los mecanismos directos, se destaca el micoparasitismo, proceso por el cual logra degradar la pared celular del huésped con el fin de asimilar y nutrirse a partir del contenido celular del mismo (Ruiz, 2011). Otros mecanismos directos implicados en el control incluyen la competencia y la capacidad de secretar inhibidores del crecimiento y compuestos difusibles importantes en el control biológico. Los compuestos secretados al medio extracelular juegan un papel fundamental en la capacidad antagonista de estos hongos, y están representados por la producción de metabolitos secundarios que muestran una consecuencia inhibitoria o mortal sobre un hongo fitopatógeno (Masi et al., 2018). En cuanto a los mecanismos indirectos, son todos aquellos implicados en mejorar las defensas de las plantas frente a los patógenos, es capaz de interactuar con las raíces de las plantas, colonizando la superficie de raíces de una gran variedad de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Tyśkiewicz et al., 2022), lo que proporciona una ventaja a la planta huésped frente al ataque del patógeno. Se ha reportado que la interacción con *Trichoderma* activa la respuesta de defensa vegetal, así como también promueve el desarrollo radicular de las plantas (Alfiky et al., 2021; Marra et al., 2020).

El género *Trichoderma* se caracteriza por su agresiva competencia y rápida colonización en una amplia variedad de sustratos (Sood et al., 2020), lo que lo convierte en un fuerte competidor en la rizósfera. Además, estos hongos son invasivos, filamentosos, oportunistas, avirulentos y establecen una relación simbiótica con las plantas, lo que los hace especialmente prometedores para su uso en productos destinados al control de enfermedades fúngicas en diversos cultivos (Vinale et al., 2008).

Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* se ha estudiado ampliamente por su capacidad para proporcionar protección contra patógenos y promover el crecimiento de las plantas (Figura 1). Estos hongos utilizan múltiples estrategias para combatir las enfermedades que afectan a las plantas, tales como la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia por recursos y territorio, la promoción del crecimiento vegetal y la inducción de mecanismos de defensa en las plantas (Manzar et al., 2022). A continuación, se describirán las características más relevantes de cada una de ellas.

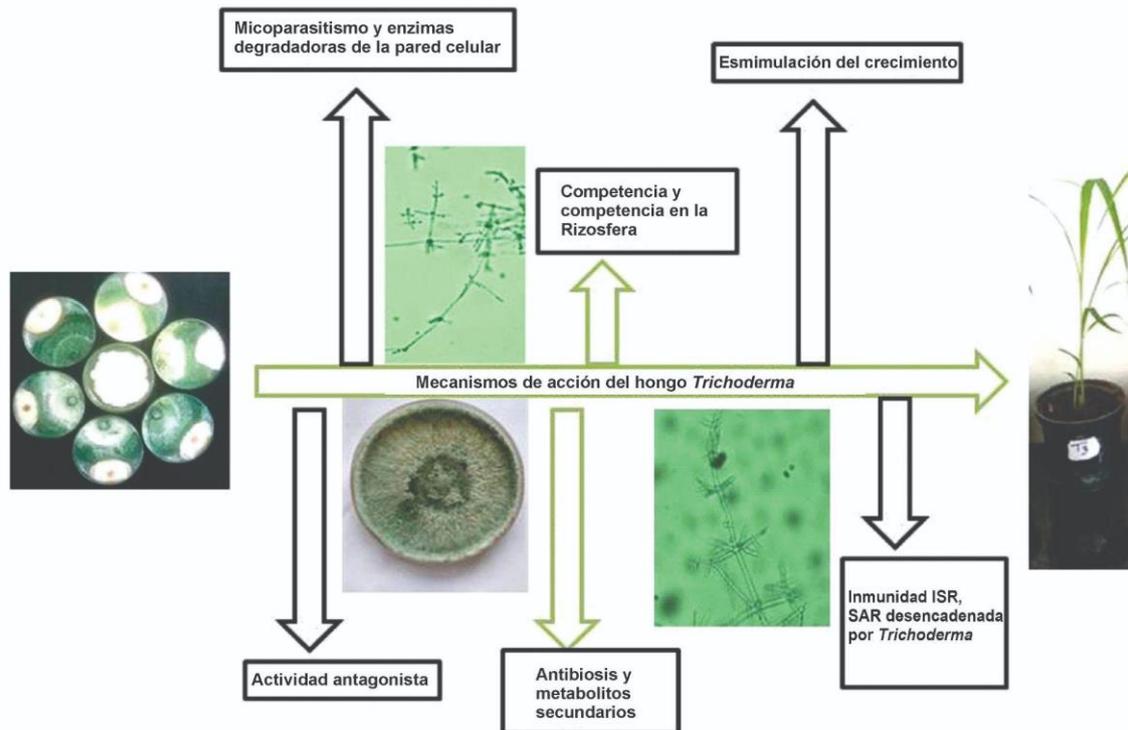


Figura 1. Mecanismos de biocontrol utilizados por *Trichoderma* contra patógenos de plantas y para promover cultivos saludables. Imagen adaptada de Manzar et al., 2022.

a) competencia

Para que *Trichoderma* pueda colonizar la rizosfera de las plantas y proporcionar beneficios, debe competir con otros microorganismos por los nutrientes y exudados de las raíces. Los exudados son ricos en polisacáridos altamente hidratados, monosacáridos y disacáridos (Hermosa et al., 2012). Para competir con otros microorganismos, *Trichoderma* utiliza mecanismos de micoparasitismo y segregación de sustancias al medio con acción inhibitoria para otros microorganismos, principalmente patógenos. Sin embargo, es necesario testear que estos mecanismos no afecten significativamente a otros microorganismos beneficiosos.

La colonización exitosa de *Trichoderma* en las raíces de las plantas requiere la habilidad de reconocer y adherirse a las raíces, penetrar en la planta y resistir los metabolitos tóxicos que produce en respuesta a la invasión. El diálogo molecular fluido entre la planta y *Trichoderma*, mediado por moléculas similares a efectores, es clave en el éxito de la colonización (Ramírez-Valdespino et al., 2019).

La adhesión a la superficie de la raíz por *Trichoderma* podría ser mediada por hidrofobinas, proteínas pequeñas y hidrofóbicas ubicadas en la capa más externa de la pared celular que recubren la superficie de las células fúngicas (Hermosa et al., 2012). Además, se ha demostrado que proteínas similares a las expansinas están involucradas en el desarrollo de la pared celular en *Trichoderma*, reconociendo la celulosa y modificando la arquitectura de la pared celular de la planta, lo que facilita la colonización de las raíces (Brotman et al., 2008).

b) micoparasitismo

El micoparasitismo es una forma de interacción entre dos hongos en la cual uno de ellos ataca deliberadamente al otro para obtener nutrientes del huésped. Cuando esta interacción conduce a la muerte del huésped, se la denomina micoparasitismo necrófilo, que es el tipo de interacción que *Trichoderma* utiliza en la mayoría de sus interacciones parasitarias (Viterbo et al., 2010). El micoparasitismo es un proceso complejo que depende de una combinación de mecanismos que actúan en forma secuencial o conjunta.

La interacción comienza con el reconocimiento del huésped por parte del parásito, que probablemente es atraído hacia el huésped mediante un efecto de quimiotropismo. Además, las señales del huésped pueden actuar a distancia sin contacto entre los dos hongos, ser reconocidas por *Trichoderma* y comenzar con una cascada de metabolitos secretados al medio extracelular, entre los cuales se encuentran enzimas que degradan la pared celular. (Vinale et al., 2008). Al entrar en contacto con el huésped, *Trichoderma* se adhiere y forma estructuras en forma de gancho similares a apresorios, que ayudan a penetrar la pared celular del huésped (Elad et al., 1983). La penetración parece ocurrir tanto mecánicamente a través del apresorio y el enrollamiento, como enzimáticamente mediante la secreción de una serie de enzimas que degradan la pared celular (Viterbo et al., 2002).

Además, es importante destacar que el micoparasitismo es un proceso altamente regulado y coordinado, donde se han identificado varios genes involucrados en la patogenicidad de *Trichoderma* (Mukherjee et al., 2013). Estos genes codifican para enzimas que degradan la pared celular, proteínas que reconocen señales del huésped y factores de transcripción que regulan la expresión génica durante la interacción con el huésped. Todo esto sugiere que la capacidad de *Trichoderma* para interactuar y colonizar huéspedes está muy bien adaptada y regulada a nivel genético y molecular.

c) antibiosis

Trichoderma es un género de hongos reconocido por su capacidad para producir una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales pueden tener diferentes efectos beneficiosos en las plantas. Algunos de estos compuestos son quelantes de hierro, inductores de resistencia vegetal, promotores del crecimiento vegetal y antibióticos. Estos últimos, son capaces de afectar a otros organismos, inhibiendo su crecimiento o provocando la muerte. La producción de estos metabolitos se ha demostrado en diversas especies de *Trichoderma* y se han identificado múltiples compuestos diferentes, tanto volátiles como no volátiles (Mukhopadhyay y Kumar., 2020).

Además de producir metabolitos, se ha constatado que las especies de *Trichoderma* también producen enzimas hidrolíticas y proteasas, como exo y endoquitinasas, quitinasas, xilanasas, glucanasas, lipasas, endo y exopeptidasas, entre otras, que tienen una acción antifúngica (Guzman-Guzman et al., 2023). Esta capacidad de producir enzimas puede ayudar a *Trichoderma* a competir con otros hongos en el suelo y en las raíces de las plantas.

d) promoción del crecimiento

La presencia de *Trichoderma* puede impactar el crecimiento de las plantas tanto de manera indirecta como directa. En relación con el crecimiento directo, la producción de ácido indolacético (AIA) por parte de *Trichoderma* se relaciona con un aumento en la masa de las raíces laterales y la raíz total, así como con una mayor altura y peso seco de la parte aérea de la planta (Nieto-Jacobo et al., 2017). La síntesis de AIA también puede modificar la arquitectura de la raíz, resultando en una absorción más eficiente de nutrientes por parte de la planta (Contreras-Cornejo et al., 2009).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la relación entre la síntesis de AIA y la promoción del crecimiento de las plantas en sistemas basados en suelo no es clara. Aunque muchas cepas de *Trichoderma* pueden sintetizar AIA, sólo unas pocas pueden promover el crecimiento de las plantas (Hoyos-Carvajal et al., 2009). Por lo tanto, la promoción del crecimiento de las plantas no es un rasgo universal de todas las cepas de *Trichoderma* (Nieto-Jacobo et al., 2017).

Por otro lado, la estimulación del crecimiento también puede darse de manera indirecta a través de la degradación de nutrientes por parte de *Trichoderma*, lo que los hace más disponibles para las plantas. Además, *Trichoderma* produce una gran variedad de metabolitos volátiles con capacidad de estimular el crecimiento, principalmente por vías dependientes de auxinas (Garnica-Vergara et al., 2015; Nieto-Jacobo et al., 2017).

e) inducción de la defensa vegetal

Cuando las plantas interactúan con microorganismos, se activan dos mecanismos de defensa principales que las protegen contra la infección. El primero de ellos es la resistencia sistémica adquirida o SAR (del inglés, *Systemic Acquired Resistance*), que se desencadena por una infección local y puede brindar protección a largo plazo contra la infección por diferentes patógenos. La síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis está correlacionada con SAR y es mediada por la regulación positiva de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis del ácido salicílico (SA) (Zhang et al., 2010; Vlot et al., 2009).

Por otro lado, el segundo mecanismo, conocido como Resistencia Sistémica Inducida o ISR (del inglés, *Induced Systemic Resistance*), se correlaciona con la síntesis de ácido jasmónico y etileno, y está mediado por los factores de transcripción MYC2 y ERF (Shoresh et al., 2005; Pieterse et al., 2012). Este tipo de resistencia mejora la respuesta de defensa vegetal ante el posterior ataque de patógenos y suele relacionarse con microorganismos benéficos, especialmente rizosféricos.

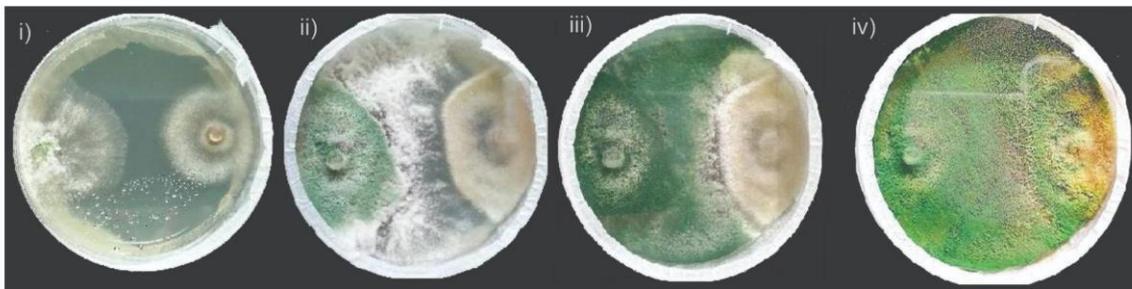
Se cree que *Trichoderma* es capaz de activar ambos tipos de resistencia, por lo que se plantea la hipótesis de que las plantas perciben la colonización de sus raíces por estos microorganismos, lo que desencadena la activación de mecanismos ISR (Shoresh et al., 2005; Tucci et al., 2011). Además, en un sistema tripartito de planta/organismo benéfico/patógeno, se ha observado la reprogramación transcripcional simultánea de genes relacionados con la defensa vegetal y efectores de patógenos (La Spada et al., 2020).

Antecedentes del proyecto

En el marco del proyecto estudiantil titulado "Caracterización molecular de la interacción *Trichoderma-Cannabis*", se logró identificar la cepa M2 (aislada y registrada por la empresa Khyma Soluciones Biológicas) a nivel de especie. Para ello, se utilizaron técnicas de PCR convencional para amplificar regiones específicas de especie, las cuales fueron reportadas previamente. Posteriormente, se llevó a cabo la secuenciación y comparación de las secuencias con la base de datos GenBank. Los resultados revelaron que la cepa corresponde a la especie *Trichoderma asperellum*.

Además, se realizaron cultivos duales con *Botrytis cinerea*, lo que permitió demostrar la capacidad de la cepa M2 para colonizar y antagonizar al patógeno (Figura 2a). Asimismo, se llevaron a cabo ensayos en plantas de *Cannabis sativa*, utilizando distintas concentraciones del producto comercial a base de la cepa M2. En estos ensayos, se observaron diferencias significativas en la altura, longitud de la raíz y peso seco de las plantas tratadas con *Trichoderma* en comparación con las plantas control (Figura 2b-c).

a)



b)



c)

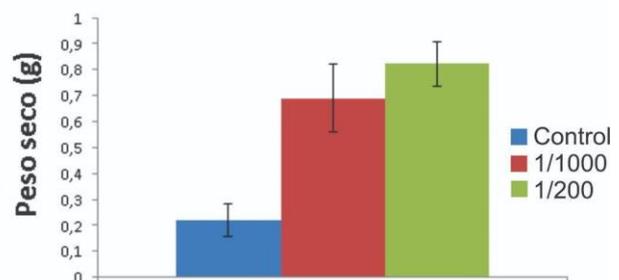


Figura 2. Capacidad antagónica y bioestimulante de *Trichoderma asperellum* (M2). **a)** Enfrentamiento M2 (izquierda), *Botrytis cinerea* (derecha). Los cultivos se realizaron en medio PDA (Potato dextrosa Agar), con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a 26 C y humedad constante. i)-iv) 24, 48, 72 y 96 horas de crecimiento respectivamente. **b)** Crecimiento en mezcla de turba, vermiculita y arena (3:1:1/2) de plantas de cáñamo, inoculadas con distintas concentraciones de M2 (1/1000 ml y 1/200 ml) o sin inocular (control), crecidas durante 30 días. **c)** Medidas de peso seco de plantas de cáñamo inoculadas con dos concentraciones de M2 (1/1000 ml y 1/200 ml) y plantas sin inocular (control).

Estos hallazgos fueron de gran relevancia para la empresa Khyma y la Facultad de Ciencias, ya que permitieron establecer un primer acercamiento y una colaboración en este campo. Los resultados obtenidos en este proyecto fueron fundamentales para lograr el registro comercial ante el MGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca), convirtiéndose en el primer registro comercial realizado en Uruguay para la cepa *Trichoderma asperellum* (Número de registro: 5440).

En el contexto de la bioprotección y bioestimulación de cultivos, la empresa Khyma ha logrado recientemente aislar una nueva cepa del género *Trichoderma*, denominada C1, con características prometedoras. El objetivo de esta tesis es identificar a nivel molecular la cepa C1 y compararla con la cepa M2, su capacidad antagónica frente a patógenos altamente problemáticos en nuestra región, así como su capacidad para promover el crecimiento vegetal. Se espera que los resultados de esta tesis aporten información relevante para la formulación de estrategias de control biológico más efectivas y amigables con el medio ambiente en el ámbito agrícola.

Objetivos

Objetivo General

Comparar la capacidad antagónica de las cepas C1 y M2 de *Trichoderma* frente a diferentes fitopatógenos y explorar sus mecanismos de acción para promover el crecimiento vegetal.

Objetivos específicos

- Identificar a nivel molecular la cepa C1.
- Evaluar la capacidad antagónica de las cepas M2 y C1 de *Trichoderma* frente a diferentes fitopatógenos.
- Determinar si las cepas M2 y C1 son capaces de producir metabolitos volátiles e hidrosolubles con capacidad antifúngica.
- Evaluar la capacidad bioestimulante de ambas cepas.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento

Las dos cepas de *Trichoderma* analizadas en este estudio, fueron cedidas por la empresa Khyma, las cuales fueron denominadas M2 y C1. M2 forma parte de un producto comercial registrado ante DGSA, número de registro 5440, y fue aislada en la zona de Carmelo, departamento de Colonia, Uruguay. La cepa C1 proviene de un aislamiento realizado recientemente por la empresa en la zona de Melilla, Montevideo, Uruguay. Las cepas se cultivaron en medio PDA (Potato Dextrose Agar), en incubadora a 25°C.

Las cepas: *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum*), *Trichoderma atroviride* (*T. atroviride*), *Trichoderma asperellum* (*T. asperellum*) serán utilizadas como controles. Estas cepas fueron cedidas por la Sección Micología del Instituto de Biología de la Facultad de Ciencias.

Los patógenos utilizados para los enfrentamientos y pruebas de metabolitos secundarios, también fueron cedidos por la misma Sección. Los patógenos utilizados para este estudio fueron *Sclerotium rolfsii* (*S. rolfsii*), *Alternaria alternata* (*A. alternata*), *Fusarium graminearum* (*F. graminearum*) y *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*), los cuales fueron aislados a partir de tejido vegetal de plantas de cáñamo con síntomas de enfermedad, en Uruguay.

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Todas las plantas usadas en este estudio pertenecen al fondo genético Columbia (Col-0) de *Arabidopsis thaliana*. Las líneas transgénicas de *Arabidopsis* DR5::GFP, poseen un marcador inducible por auxina (Ottenschläger et al., 2003). Las semillas fueron desinfectadas en superficie con etanol al 95% (v/v) durante 5 minutos y con Hipoclorito de Sodio al 2% (v/v) durante 7 minutos, lavadas cinco veces con agua destilada y estratificadas durante 2 días a 4°C. Las semillas se germinaron y cultivaron en placas de agar conteniendo medio de Murashige y Skoog (1962) 0,2X (mezcla de sales basales MS), sacarosa al 0,6% y agar al 1% a pH 7. Todos los experimentos se realizaron en cuarto de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz) y a 22°C.

Identificación molecular de *Trichoderma*

El ADN genómico para cada una de las cepas fue aislado a partir de hifas jóvenes de cultivos puros crecidos en PDA utilizando el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La cuantificación y pureza de las muestras de ADN se realizó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Para la amplificación por PCR de las regiones de interés, se utilizaron los cebadores que se detallan en la Tabla 1. La amplificación se realizó utilizando el programa: 98°C 5 min; 40 ciclos: 98°C 10 seg, 56°C 20 seg, 72°C 20 seg; 72°C 5 min.

Para confirmar la especificidad de la PCR, se emplearon ADN genómicos de las cepas proporcionadas por la sección Micología de la Facultad de Ciencias, las cuales fueron identificadas previamente como *T. atroviride*, *T. asperellum* y *T. harzianum*.

La amplificación se efectuó en un termociclador SimpliAmp de Applied Biosystem.

Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µL utilizando 50 ng de ADN genómico de cada cepa, 1X buffer, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 µM de cada cebador y 1.25 unidades de *Phusion High Fidelity DNA polymerase* de la empresa (Thermo Scientific). Los productos de amplificación fueron analizados en gel de agarosa 1 % y purificados mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

Tabla 1. Secuencia de cebadores seleccionados

Especie	Secuencia de cebadores	Gen	Tamaño del producto (bp)	Referencias
<i>T.hamatum</i>	HAM450-F: TTGACACGGTTCTATAATTACCAA HAM-450R: TGACTTAAGTAAGCCGGTCAAG	marcador SCAR	400	Meena, 2009
<i>T.virens</i>	TvCTT56f: CTTGATGACAAGCCAAAAGG TvCTT56r: GAAGAGAGGACATAGGGTCTGG	marcador SSR	289	Geistlinger et al., 2015
<i>T.harzianum</i>	Th1F: TTGCATGGGTTTCGCTAAAGG Th1R: TCTTGTCAGCATCATGGCCGT	<i>rpb2</i>	824	Prabhakaran et al., 2015
<i>T.asperellum</i>	T2AF: CTCTGCCGTTGACTGTGAACG T2AR: CGATAGTGGGGTTGCCGTC	<i>tef1</i>	507	Prabhakaran et al., 2015
<i>T.atroviride</i>	11A1: GGAAGCTTGGCGTTTATTGTACAA 11A1c: GGAAGCTTGGGTATTGAGCTGGGC	<i>TrAtP1</i>	990	Hermosa et al., 2001

Los productos de PCR, fueron secuenciados en Macrogen, Corea. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos Genbank (NCBI) utilizando el algoritmo BLASTn.

Cultivos duales

Se colocaron discos de 5 mm de micelio de M2 o C1 y de cada uno de los patógenos (*S. rolfisii*, *A. alternata*, *F. graminearum* y *B. cinerea*), a ambos lados de la placa de Petri, de 9 cm de diámetro en medio PDA, y se crecieron a 25°C durante 7 días en incubadora. Se analizó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) del patógeno según la siguiente ecuación PICR:

$$\text{PICR} = [(R1-R2) / R1 \times 100]$$

donde R1 es el crecimiento radial del testigo y R2 el crecimiento radial del patógeno (Samaniego et al., 1989). Los experimentos se realizaron con 3 réplicas biológicas, y se repitieron 3 veces obteniendo resultados similares.

Ensayo de metabolitos volátiles

Se emplearon placas de Petri invertidas en el ensayo para ver si las cepas M2 y C1, podrían afectar el crecimiento, y en qué medida, de los distintos patógenos. (Li et al., 2018). En este experimento, se sembraron los patógenos y *Trichoderma* en placas de PDA. Las bases de las placas con patógenos se colocaron sobre las bases de las placas de *Trichoderma* y se cubrió la unión entre ambas bases con parafilm antes de incubar a 25°C durante 5 días (Dennis y Webster., 1971). Se incluyó una placa de PDA sin inocular como control para cada placa de los distintos patógenos. Después de 5 días, se midió el diámetro de crecimiento para cada patógeno y se calculó el PICR

Ensayo de metabolitos difusibles

Se crecieron masivamente las dos cepas de *Trichoderma* en arroz integral como sustrato, en bolsas de propileno, a una temperatura de 25°C, por 12 días (desarrollado por khyima). Luego se extrajeron mecánicamente las esporas utilizando una solución de Tween al 0.01%, obteniendo así una suspensión de esporas de ambas cepas de *Trichoderma*. Se utilizaron filtros estériles con un poro de 0.22 µm, con el fin de excluir las esporas y recolectar únicamente los metabolitos secundarios producidos por cada una de las cepas (Baazeem et al., 2021). Posteriormente los eluidos se mezclaron con medio PDA al 50% en placas de Petri y se sembraron los distintos patógenos. Finalmente se analizó según la ecuación PICR descrita anteriormente. Para este ensayo, en los controles no se incluyó metabolitos secundarios, sino solamente medio PDA con solución Tween al 0.01%.

Efecto de *Trichoderma* en la arquitectura de las plantas de *Arabidopsis thaliana*

Se inoculó un disco de 5 mm de ambas cepas de *Trichoderma* (C1 Y M2), en placas de petri con medio MS, en las cuales se encontraban las plantas de *Arabidopsis thaliana* de 2 días de crecimiento, como control se utilizó un disco de PDA. A los 4 días después de la inoculación, se determinó el peso fresco total en una balanza analítica para 10 plantas. El largo de pelos radiculares en la zona cercana a la punta de la raíz principal, y el número de raíces laterales se determinó contando las raíces laterales presentes en la raíz primaria desde la punta hasta la transición de la raíz/tallo. Las imágenes se registraron utilizando una cámara digital (Nikon D3300, Osaka, Japón) y se procesaron utilizando el software IMAGEJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, Estados Unidos). Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces, con resultados similares.

Efecto de *Trichoderma* en la acumulación y transporte de auxinas utilizando líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

Para investigar si la presencia de *Trichoderma* influye en la acumulación de auxinas en la planta, se realizaron ensayos de confrontación utilizando una línea transgénica de *Arabidopsis* con el promotor DR5 sensible a auxinas fusionado al gen de la β-glucuronidasa (GUS), como se describe en Ulmasov et al. (1997). Los ensayos se llevaron a cabo tal como

se describe en la sección Influencia de *Trichoderma* en la Arquitectura de las plantas de Arabidopsis en Placas de Agar, excepto que se seleccionó la línea de plantas DR5::GUS.

Después de 5 días de interacción con *Trichoderma spp.* (C1 Y M2), se retiraron las plántulas DR5::GUS y se sometieron a vacío e incubaron a 37°C durante 1 hora en una solución de tinción GUS (50 mM de tampón fosfato sódico, pH 7.0, 0.1% de Tritón X-100, 1.5 mM de ferricianuro potásico, 1.5 mM de ferrocianuro potásico y 1.5 mg/mL de X-Gluc). Después de la tinción, las muestras se aclararon mediante incubación con etanol al 95% durante 60 minutos, seguido de una hidratación con diluciones de etanol seriadas al 70, 60, 40, 20 y 10% durante 60 minutos. Las plántulas se visualizaron mediante una lupa estereoscópica Zeiss.

Resultados y discusión

Identificación morfológica

En este estudio, se utilizaron dos cepas que presentaron diferencias morfológicas macroscópicas entre sí, aunque ambas cumplían con las características básicas del género *Trichoderma* (Matas-Baca et al., 2022). Ambas cepas presentaron micelio blanco de consistencia esponjosa que se extendió rápidamente por toda la placa, de dos a tres anillos concéntricos, con conidios de color amarillo verdoso (Figura 3). Sin embargo, la cepa M2, identificada previamente como *T. asperellum*, mostró abundante conidiación oscura y rápida de color amarillento, mientras que la cepa C1 exhibió una conidiación con tonos verdosos y no tan abundante. Estas diferencias morfológicas nos llevaron a pensar que la cepa C1 posiblemente no perteneciera a la especie *T. asperellum*.

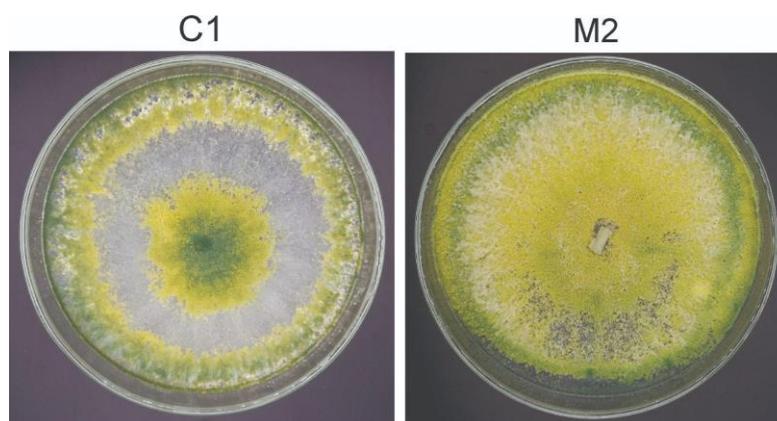


Figura 3. Aspecto macroscópico del crecimiento de las dos cepas cultivadas en medio PDA y mantenidas en incubadora a una temperatura constante de 25 °C durante un periodo de siete días.

Es importante destacar que la identificación preliminar de especies basada en la estructura de los conidióforos, la morfología y el tamaño de los conidios, se puede realizar con la ayuda de claves taxonómicas y descripciones disponibles en la literatura (Kubicek et al., 2008). Sin embargo, sin experiencia profesional, esto a menudo puede llevar a diagnósticos incorrectos debido a las dificultades de la identificación de especies basada en la morfología. Por lo tanto, siguiendo las recomendaciones de Kredics et al., (2014), se decidió utilizar métodos moleculares para determinar la identidad de la cepa C1.

Identificación molecular de *Trichoderma* sp.

Al inicio de la tesis, el laboratorio disponía de cuatro pares de cebadores específicos para identificar las especies *T. asperellum*, *T. harzianum* (Prabhakaran et al., 2015), *T. virens* y *T. hamatum* (Kredics et al., 2018). Se llevó a cabo una PCR con el ADN genómico de la cepa C1 para cada par de cebadores y se incluyeron los ADN genómicos de las cepas de *T. asperellum* y *T. harzianum* proporcionadas por la sección de Micología de la Facultad de Ciencias como controles positivos.

Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2%, y no se obtuvo amplificación para los pares de cebadores específicos para *T. asperellum*, *T. virens* y *T.*

hamatum (datos no presentados). En cambio, se observó un producto de amplificación de aproximadamente 700 pares de bases (pb) para el par de cebadores específicos de *T. harzianum* en la muestra problema, siendo menor al tamaño obtenido en el control positivo correspondiente a 800 pares de bases (Anexo, Figura S1). Se purificó y secuenció el producto obtenido y la secuencia fue identificada a través de una búsqueda BLAST en GenBank de NCBI. Los resultados del análisis BLAST no mostraron un elevado porcentaje de identidad con la secuencia del gen *rpb2* de *T. harzianum* que se amplificaron a partir del par de cebadores Th1F y Th1R (Tabla 1), siendo entonces la secuencia depositada con mayor similitud de secuencia la correspondiente a la cepa P1 de la especie *T. atroviride* (número de acceso CP084938.1).

En este contexto, se procedió a realizar una nueva PCR con cebadores específicos para *T. atroviride* (11-A1 y 11-A1c, de 990 pb) (Tabla 1) descritos por Kredics et al. (2018) y diseñados por Hermosa et al. (2001). Originalmente se desarrollaron para distinguir la cepa *T. atroviride* 11, de hecho, lograron diferenciarla de otras 26 cepas pertenecientes a siete especies de *Trichoderma* (Hermosa et al., 2001). Estudios posteriores realizados por Cordier et al., 2007, demostraron que este par de cebadores no era cepa específica, ya que se obtenía un producto de 990 pb en 5 de las cepas de *T. atroviride* examinadas.

Sin embargo, se consideró que estos cebadores eran adecuados para identificar la especie *T. atroviride*, ya que en ninguno de los estudios mencionados se amplificó un producto de 990 pb para una cepa que no perteneciera a *T. atroviride* (Cordier et al., 2007; Hermosa et al., 2001; Rubio et al., 2014).

Los productos amplificados con los cebadores 11-A1 y 11-A1c (Tabla 1) se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Figura 4). Se amplificó un producto del tamaño esperado (990 bp) en la muestra problema y en la cepa conocida de *T. atroviride* que ofició como control positivo.

Se realizó la purificación del producto de PCR obtenido de la muestra problema y posteriormente se envió a secuenciar utilizando ambos cebadores (11-A1 y 11-A1c) para asegurar una mayor cobertura de secuencia. Después de depurar y ensamblar las secuencias obtenidas, se procedió a comparar la secuencia resultante con la base de datos de GenBank mediante

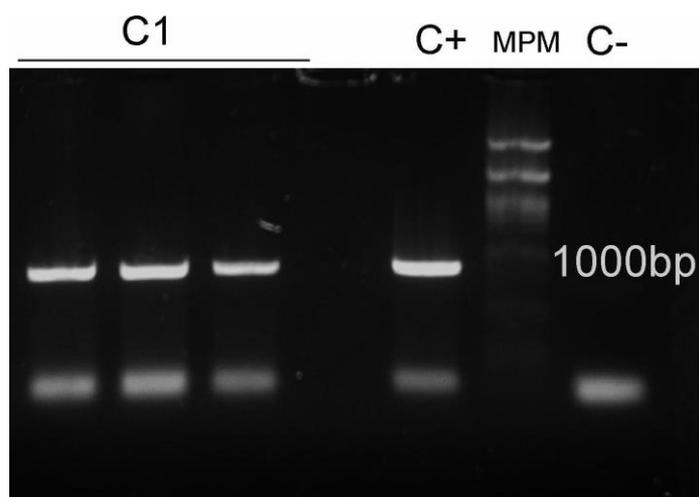


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1,5%, para los cebadores de *T. atroviride*. C1: ADN de la cepa C1, C+: control positivo (cepa conocida de *T. atroviride*), C-: control negativo (sin ADN), MPM: marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

BLASTn. Los resultados indicaron que la secuencia de la cepa C1 presentó una identidad del 90% con 490/555 pares de bases idénticos a una región del cromosoma 5 de la cepa P1 de *Trichoderma atroviride*, lo cual coincide con la identificación previa utilizando los cebadores Th1F y Th1R.

Control biológico

a) enfrentamientos

Los cultivos duales en placa arrojaron resultados similares para ambas cepas. En todos los casos tanto la cepa C1 como la cepa M2, lograron un crecimiento radial mayor al de los patógenos enfrentados (Tabla 2).

En el caso de *F. graminearum*, se observó una tasa de inhibición del $55,9\% \pm 2,69$ para la cepa M2 y del $60,5\% \pm 2,45$ para la cepa C1 (Tabla 2). Sin embargo, el comportamiento de ambas cepas frente al patógeno fue diferente. La cepa C1 presentó un crecimiento sin detenerse en ningún momento, mientras que la cepa M2 expresó un halo de inhibición mutua al entrar en contacto con *F. graminearum* (Figura 5a), pero logró sobrepasar y comenzar a crecer sobre el patógeno.

La inhibición del crecimiento de patógenos en cultivos duales con *Trichoderma* spp. en el sitio de contacto se puede atribuir a varios factores, incluyendo la producción de compuestos inhibidores tanto volátiles como no volátiles, terpenos, pironas y policétidos. Además, se ha observado que algunas especies de *Trichoderma* producen enzimas hidrolíticas extracelulares capaces de inactivar las enzimas del patógeno (Hewedy et al., 2020). A pesar de que en la cepa C1 el halo de inhibición es indistinguible, logró un crecimiento mayor a M2 sobre *F. graminearum* a los 7 días post enfrentamiento, (Figura 5a). Cabe considerar que *Fusarium* fue, en este estudio, fue el segundo patógeno con menor crecimiento (Tabla 2), por

debajo de *A.alternata*, lo que puede indicar también que ambas cepas de *Trichoderma* se beneficiaron de su crecimiento veloz y su capacidad de colonizar el sustrato más rápidamente, como un mecanismo esencial para competir con el patógeno.

Tabla 2. Resultados de los cultivos duales, frente a las cepas C1 y M2. ctrl: muestra control, prob: muestra problema

patógeno	M2		C1	
	crecimiento radial (cm)	Inhibición del crecimiento radial (%)	crecimiento radial (cm)	Inhibición del crecimiento radial (%)
	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio
<i>Fusarium graminearum</i> ctrl	4,5 ± 0,06	---	3,5 ± 0,42	---
<i>Fusarium graminearum</i> prob	2,0 ± 0,1	55,9 ± 2,69	1,4 ± 0,15	60,5 ± 2,45
<i>Sclerotium rolfsii</i> ctrl	8,50	---	8,50	---
<i>Sclerotium rolfsii</i> prob	2,3 ± 0,06	73,3 ± 0,68	3,0 ± 0,15	65,1 ± 1,8
<i>Alternaria alternata</i> ctrl	2,7 ± 0,26	---	3,1 ± 0,31	---
<i>Alternaria alternata</i> prob	1,3 ± 0,1	51,3 ± 8,08	1,4 ± 0,12	53,9 ± 6,7
<i>Botrytis cinerea</i> ctrl	8,50	---	8,50	---
<i>Botrytis cinerea</i> prob	3,2 ± 0,1	62,4 ± 1,18	3,0 ± 0,2	64,7 ± 2,35

Los enfrentamientos de las cepas M2 y C1 con *S. rolfsii* mostraron una mayor inhibición del crecimiento radial en comparación con el control (Tabla 2), con una inhibición del 73.3% ± 0,68 y del 65,1% ± 1.8 respectivamente, además *S. rolfsii* no fue capaz de seguir creciendo una vez que entró en contacto con cualquiera de las dos cepas estudiadas. A su vez, la cepa M2 mostró una diferencia marcada en el control de los demás patógenos respecto a C1 (Tabla 2). Es importante destacar que en el momento de tomar las fotografías (a los 7 días de crecimiento), la cepa M2 había sobrepasado el halo de inhibición característico y había comenzado el sobrecrecimiento, mientras que la cepa C1 permaneció estática a pesar de estar en contacto (Figura 5b). Todas las réplicas del control de *S. rolfsii* exhibieron un radio de colonia de 8.5 cm a los 7 días (Tabla 2), lo que corresponde al total del frente de avance en una placa de Petri (Figura 5b) y sugiere una tasa de crecimiento radial mayor a la que exhibieron *A. alternata* y *F. graminearum* (Tabla 2). Por lo tanto, estos resultados sugieren que ambas cepas de *Trichoderma* utilizaron nuevamente su rápido crecimiento y capacidad de colonización, a pesar de que en este caso el patógeno exhibió una tasa de crecimiento considerablemente mayor que otros patógenos analizados en este estudio, puede deberse a que el agotamiento de los nutrientes causado por el rápido crecimiento del antagonista ralentiza o inhibe el crecimiento del patógeno (Coulibaly et al., 2022). En un estudio previo realizado por Manganiello et al. (2021), se reportaron datos similares en cuanto al porcentaje de inhibición del crecimiento de *S. rolfsii* en cultivos duales similares a los de este trabajo. Los autores reportaron una inhibición máxima del 70% para las 16 cepas estudiadas, incluyendo las pertenecientes a la especie *T. atroviride*, y una inhibición mínima del 40%. En 2014, Poosapati et al. también describieron porcentajes similares de inhibición en cultivos duales entre 50% y 68% en cepas de *Trichoderma asperellum* termotolerantes y resistentes al estrés salino respectivamente.

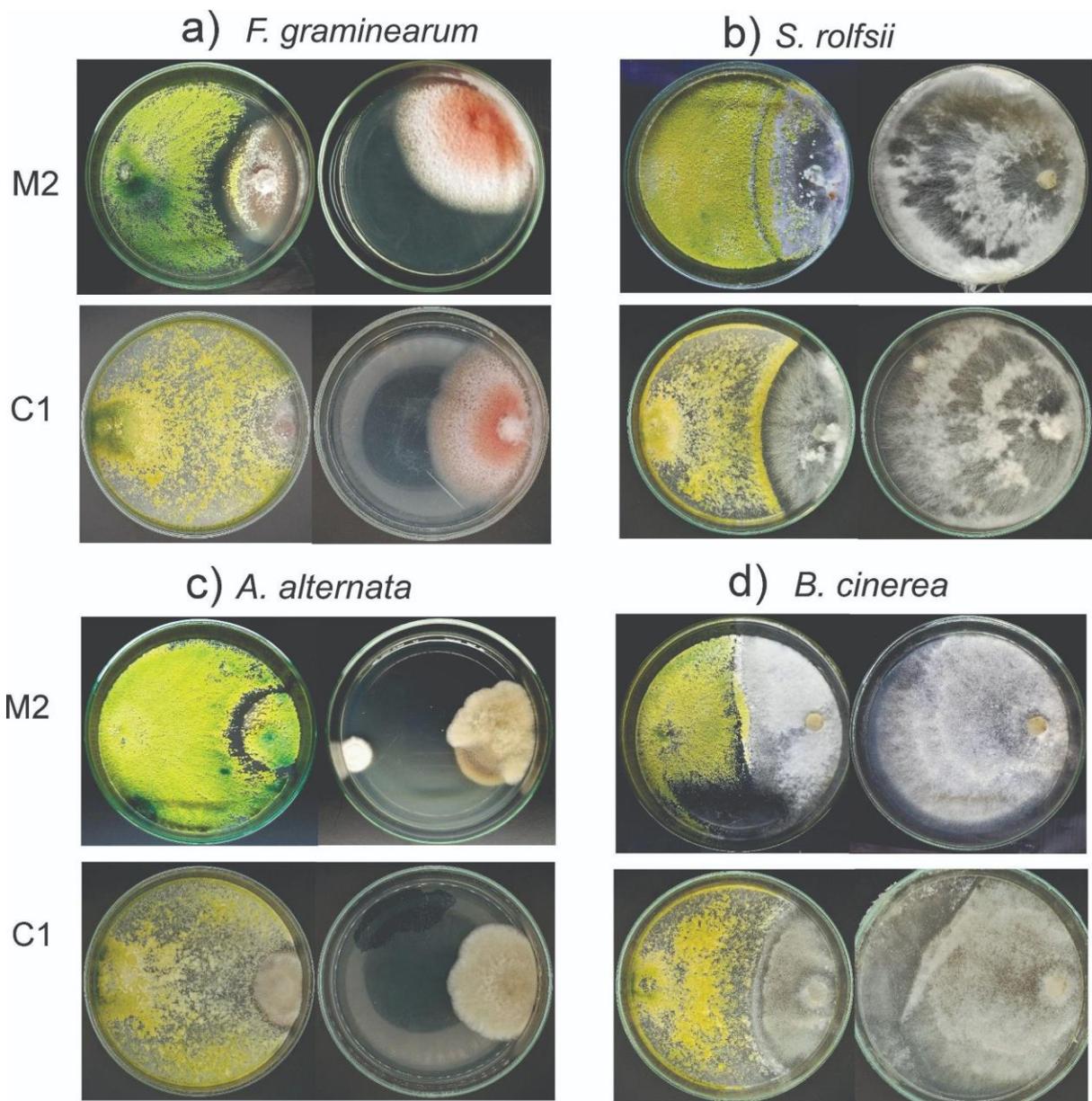


Figura 5. Resultados de cultivos duales a los siete días de incubación a 25 C. A la izquierda las M2 y C1 versus el patógeno indicado en la figura. A la derecha los controles correspondientes a los patógenos de cada ensayo.

Los experimentos realizados en este trabajo revelaron que tanto la cepa M2 como la C1 exhibieron porcentajes de inhibición del crecimiento considerables y cercanos al máximo reportado por autores previos. Estos indican que los mecanismos antagonistas utilizados por ambas cepas son efectivos para inhibir el crecimiento de *S. rolfsii*. Sin embargo, en términos de micoparasitismo, la cepa M2 mostró un mejor desempeño en el crecimiento y esporulación sobre el patógeno. Además, el halo de inhibición expresado por la cepa M2 sugiere la secreción de metabolitos antifúngicos al medio extracelular, lo que podría ser un factor importante en su actividad antifúngica contra *S. rolfsii* (Hewedy et al., 2020).

Tanto la cepa C1 como la cepa M2 lograron antagonizar a *A. alternata* con porcentajes de inhibición mayores al 50%. Este patógeno mostró un mayor desvío estándar, posiblemente por tener una menor tasa de crecimiento (Tabla 2). Es importante destacar que la cepa M2

logró crecer sobre la totalidad de la superficie cubierta por el patógeno, mientras que la cepa C1 cubrió principalmente la zona de interacción (Figura 5c). El halo de inhibición en la zona de contacto fue más pronunciado en los enfrentamientos con la cepa M2, lo que confirmó un patrón diferencial respecto a la cepa C1, que no expresó ningún halo de inhibición aparente. En cuanto al micoparasitismo, la cepa M2 creció completamente sobre el patógeno al momento de la fotografía (7 días de incubación) y demostró una abundante conidiación de color verde amarillento. Este enfrentamiento representó el único de todo el experimento en el que la cepa M2 logró colonizar completamente al patógeno (Figura 5c).

Finalmente, en respuesta al desafío frente a *B. cinerea*, ambas cepas lograron un porcentaje de inhibición superior al 60% (Tabla 2). M2, además, fue capaz de expresar sobrecrecimiento sobre el patógeno (Figura 5d). Estos resultados sugieren que ambas cepas utilizan su rápida velocidad de crecimiento y mecanismos de competencia para hacer frente al patógeno. En ausencia de *Trichoderma*, *B. cinerea* presentó una tasa de crecimiento mayor en comparación con los otros patógenos estudiados (Tabla 2).

b) antibiosis

En este estudio, se investigó si las cepas M2 y C1 de *Trichoderma* spp. son capaces de producir metabolitos volátiles y difusibles que puedan tener un efecto de inhibición sobre distintos patógenos fúngicos. Esto se debe a que la sinergia entre distintos modos de acción es un escenario natural para el biocontrol de patógenos fúngicos. Además, la antibiosis, que implica la síntesis por parte de *Trichoderma* spp. de componentes volátiles y antibióticos no volátiles, es uno de los posibles medios de antagonismo utilizados por estas cepas contra una amplia gama de hongos transmitidos por el suelo. (Alwadai et al., 2022).

Tabla 3 . Resultados de los ensayos frente a los eluidos de la cepa M2. ctrl: muestra control y prob: muestra problema

patógeno		M2	
		crecimiento radial (cm)	Inhibición del crecimiento radial (%)
	Promedio		Promedio
<i>Fusarium</i>	ctrl	4,22 ± 0,01	---
<i>graminearum</i>	prob	2,37 ± 0,2	43,7 ± 3,8
<i>Sclerotium</i>	ctrl	8,50	---
<i>rolfsii</i>	prob	2,03 ± 0,2	76,1 ± 1,8
<i>Alternaria</i>	ctrl	2,3 ± 0,07	---
<i>alternata</i>	prob	1,6 ± 0,1	31,4 ± 2,1
<i>Botrytis</i>	ctrl	4,3 ± 0,01	---
<i>cinerea</i>	prob	2,6 ± 0,4	39,1 ± 8,1

En relación con los metabolitos volátiles, no se observó ningún efecto inhibitorio en ninguna de las cepas ante los patógenos evaluados (datos no presentados). Por otro lado, se observó que la cepa M2 mostró una inhibición significativa del crecimiento de *S. rolfsii* en los eluidos, con un porcentaje superior al 70% en comparación con el control (Tabla 3). Este resultado se

destacó en comparación con los porcentajes de inhibición del 30% al 40% observados para la cepa M2 frente a los demás patógenos (Tabla 3). Sin embargo, no se observó ningún porcentaje de inhibición para ninguno de los patógenos en los eluidos de la cepa C1 (datos no presentados).

La cepa M2 se destacó en este estudio por su capacidad de producir metabolitos hidrosolubles que inhiben el crecimiento de todos los patógenos, aunque su mejor desempeño fue frente a *S.rolfsii* (Figura 6), en línea con los resultados obtenidos en los enfrentamientos duales. Además, la cepa M2 mostró un halo de inhibición en los cultivos duales, posiblemente debido a la secreción de enzimas hidrolíticas extracelulares, pironas, terpenos y otros compuestos activos o competitivos contra los que también secreta el patógeno. Estos resultados respaldan investigaciones anteriores que han demostrado que las especies de *Trichoderma* utilizan distintos mecanismos de acción, como la competencia por nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, para lograr un control efectivo de los patógenos fúngicos (Rajani et al., 2021). En conclusión, la cepa M2 presenta un potencial antagonista prometedor para el control biológico de enfermedades fúngicas.

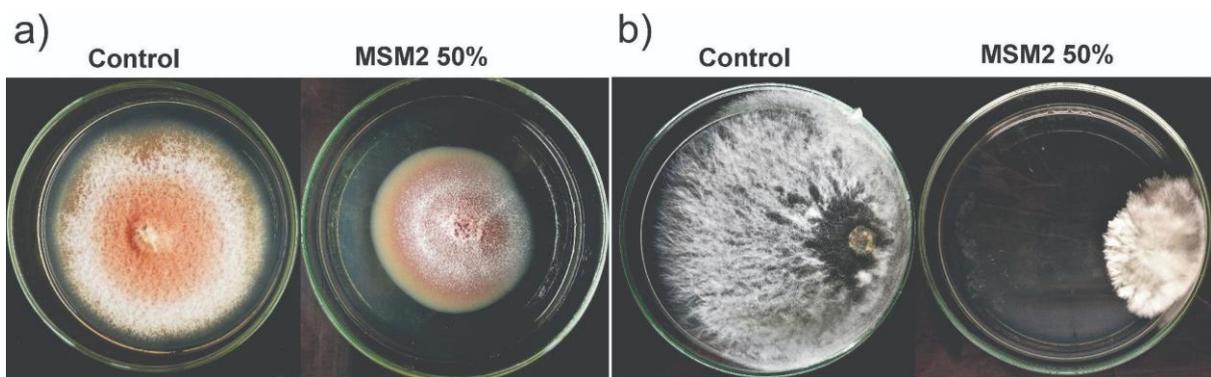


Figura 6. Ensayo de inhibición del crecimiento radial por eluidos de la cepa M2 .a) *F. graminearum*. b) *S.rolfsii*. MSM2 50%: Tratamiento con 50% de eluidos con los metabolitos secundarios de la cepa M2

Interacción con plantas de *Arabidopsis thaliana*

a) Efecto morfológico

Para estudiar los efectos de ambas cepas en interacción estrecha con una planta, se realizaron co-cultivos de *Arabidopsis thaliana* Col-0. Se estudiaron varios parámetros, como el peso fresco de las plantas, el largo de las raíces y la cantidad de pelos y raíces laterales formadas, con el fin de establecer si hubo efectos morfológicos en las plantas frente a cada una de las cepas respecto a plantas control. Los resultados muestran una clara inhibición del crecimiento en las plantas expuestas a ambas cepas (Figura 7a), con una disminución en el peso fresco de las plantas (Figura 7b) y una menor cantidad de raíces laterales en comparación con el control (Figura 7c).

Este efecto inhibitorio, aunque no letal, es similar al registrado por Metwally et al (2015), que en un estudio muy similar frente a una cepa de *Trichoderma asperellum*, evidenciaron que los metabolitos volátiles producidos durante el crecimiento del hongo tienen un efecto que altera la morfología y la fisiología de *Arabidopsis*. En el mismo estudio, identificaron al compuesto 6-pentil- α -pirona (6PP), el metabolito volátil más abundante producido por *T. asperellum*. Los autores demostraron que 6PP tiene efectos en el crecimiento de las plantas, al mismo tiempo que induce una expresión mejorada de las defensas, por otro lado las plantas expuestas a 6PP presentan una disminución de los síntomas provocados por patógenos como *A. alternata* y *B. cinerea*.

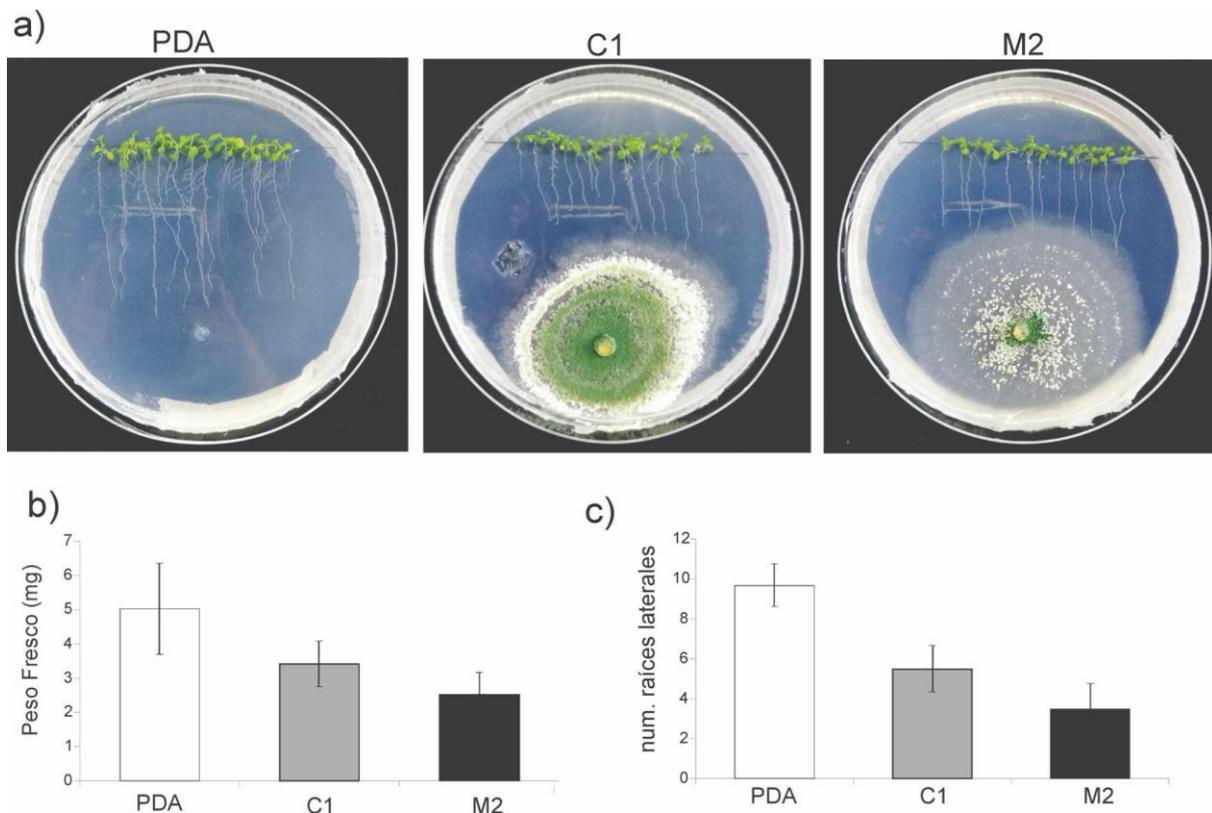


Figura 7. Co-cultivos con plantas de *Arabidopsis* en medio MS durante cinco días, con fotoperiodo 16-8 h, a temperatura ambiente. a) vista macroscópica del ensayo de plantas expuestas a un disco de 5mm de PDA, de la cepa C1 y de la cepa M2. b) Peso fresco promedio de las plantas de *Arabidopsis thaliana* en los distintos tratamientos. c) número promedio de raíces laterales por planta, para los distintos tratamientos. La barra indica el valor del desvío estándar.

En estudios previos realizados en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal se ha demostrado previamente que la cepa M2 tiene un efecto bioestimulante en plantas de cáñamo, lo que se traduce en un aumento considerable en su peso seco y vigor. Sin embargo, al observar los resultados del co-cultivo de *Arabidopsis thaliana* Col-0 con ambas cepas, se plantea la hipótesis de que los metabolitos volátiles producidos por las cepas podrían estar inhibiendo el crecimiento de *Arabidopsis*, tal como se informó en el estudio de Metwally et al. (2015).

Debido a las condiciones de co-cultivo en placas de Petri cerradas, es posible que los metabolitos se acumulen y alcancen una concentración que inhibe el crecimiento de las plantas. Esto es compatible con los hallazgos de Garnica-Vergara et al. (2016), quienes demostraron que altas concentraciones del compuesto 6PP, el metabolito volátil más abundante producido por la cepa de *Trichoderma asperellum* estudiada por Metwally et al., inhibían el crecimiento de las plantas de *Arabidopsis*, mientras que concentraciones más bajas estimulaban la producción de biomasa.

Se plantea la posibilidad de que en un estudio en macetas, donde los metabolitos volátiles pueden difundir en el aire, la concentración de los mismos no alcance un nivel suficiente para inhibir el crecimiento de las plantas. De todas maneras, es necesario realizar más investigaciones para comprender mejor el papel de los metabolitos volátiles en la interacción entre las cepas M2 y C1 con las plantas.

b) Arquitectura de la raíz y respuesta a auxinas

Las plantas co-cultivadas con la cepa C1 exhibieron alteraciones en la arquitectura de la raíz principal con respecto al tratamiento control y a la cepa M2 (Figura 8a). Es llamativa la curvatura en forma de gancho en la punta de la raíz, seguido de una inhibición del alargamiento de la raíz primaria, deteniéndose en el lugar donde ocurrió la formación del gancho antes de contactar con el micelio del hongo. Pelagio-Flores et al. (2017) atribuyen este comportamiento a la detección por parte de la planta de una señal liberada en el medio de crecimiento que provoca una redistribución de auxina en la respuesta de curvatura de la raíz a *T. atroviride*, donde las auxinas se redistribuyen dentro de la punta de la raíz y se acumulan en un lado de la columela, lo que probablemente provoque una reducción del crecimiento en un lado de la raíz y provoque una curvatura, comportamiento similar al gravitropismo.

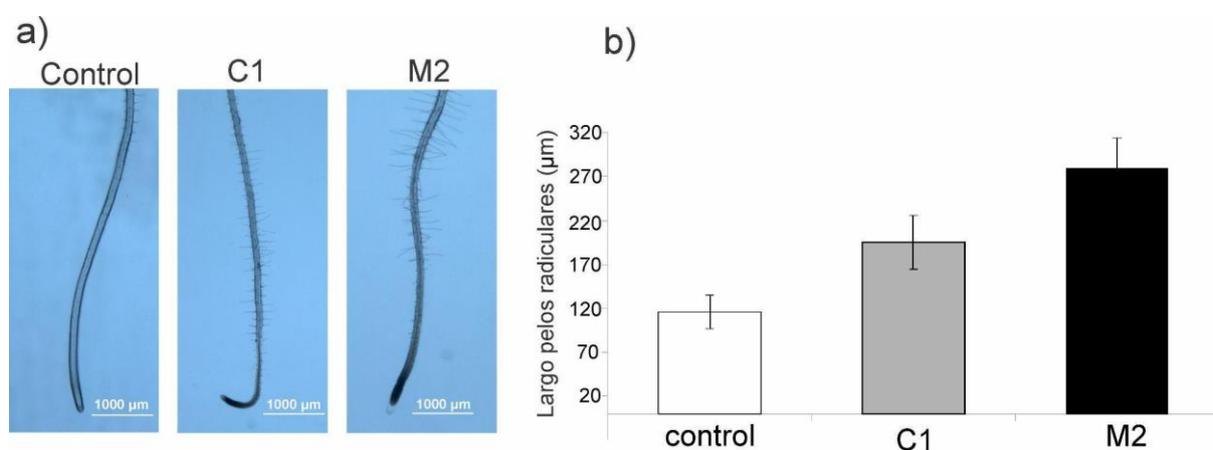


Figura 8. Arquitectura de la raíz de plantas de *Arabidopsis*. a) Vista aumentada de la zona apical de la raíz de plantas sin tratar (control) y plantas expuestas a la cepa C1 y M2 respectivamente. La barra blanca representa la escala. b) Largo promedio de los pelos radiculares de la zona cercana a la punta de la raíz. La barra negra representa el desvío estándar.

La curvatura de la punta de la raíz principal, sumado a la posible estimulación del crecimiento de los pelos radiculares (Figura 8a-b) en respuesta a la cepa C1, llevó a pensar que la cepa

C1 podría liberar auxinas al medio induciendo el fenotipo observado. Por lo tanto, se repitieron los ensayos utilizando plantas de la línea DR5:GUS de *Arabidopsis*, las cuales han sido ampliamente utilizadas como una herramienta para medir la producción de auxinas en las plantas. En esta línea de plantas, se ha insertado un gen reportero *GUS* (Beta-glucuronidasa) bajo el control de un promotor fuerte DR5 que es altamente sensible a la presencia de auxinas.

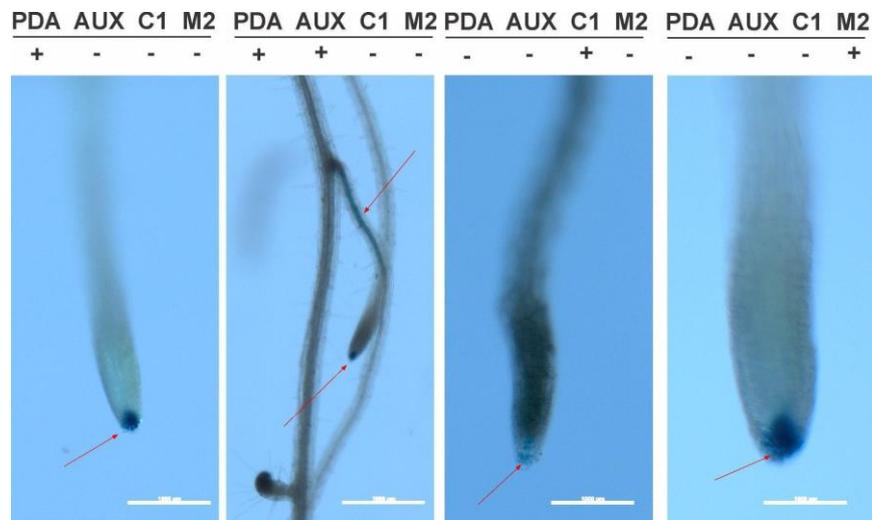


Figura 9. Expresión del gen reportero *GUS* sensible a auxina en raíces laterales después de cuatro días de crecidas y enfrentadas a cada cepa. Como control positivo se agregó auxina (5 μ M) al medio MS para ver la inducción de *GUS*. Las flechas indican la coloración azul característica producto de la acción de la enzima Beta-glucuronidasa. Las barras blancas corresponden a 1000 μ m.

En respuesta al tratamiento con ambas cepas, en este trabajo, no se observó un aumento en la expresión del gen reportero *GUS* a diferencia de lo observado tras la incubación con auxinas. (Figura 9).

Pelagio-Flores et al. en 2017 demostraron que la cepa de *T. atroviride* con la que trabajaron, exhibe una fuerte capacidad de acidificación del medio MS durante su crecimiento. Además, dicho efecto ha demostrado ser perjudicial para el crecimiento normal de *Arabidopsis*. Los investigadores también demostraron que este efecto de inhibición es reversible al incorporar una solución tampón en el medio para amortiguar la acidificación inducida por *Trichoderma*. Asimismo, los mismos autores atribuyen la curvatura de la punta de la raíz a una redistribución de auxinas debido a la disminución del pH del medio, como se observó en la cepa C1 (Figura 8a), y sugieren que la acidificación inducida por *T. atroviride* podría impactar en la funcionalidad del meristema de la raíz de *Arabidopsis*. Esta acidificación afectaría negativamente la viabilidad y división celular en las raíces primarias, lo que, a su vez, perjudica la funcionalidad del meristema apical de la raíz.

Estos hallazgos proporcionan una sólida evidencia de que la acidificación del medio por parte de ambas cepas de *Trichoderma*, así como la producción de metabolitos volátiles deben considerarse en este tipo de ensayos y serán tenidos en cuenta en futuros experimentos.

Conclusiones

En el presente estudio, se evaluaron diversos mecanismos de acción de *Trichoderma spp.* para combatir hongos fitopatógenos en cultivos. Los resultados indicaron que la cepa C1, potencialmente perteneciente a la especie *T. atroviride*, muestra una alta efectividad in vitro en la inhibición del crecimiento radial de los patógenos, logrando una inhibición superior al 50% en todos los cultivos duales evaluados. Sin embargo, no se observó una inhibición significativa del crecimiento de los patógenos mediante metabolitos secundarios difusibles ni volátiles.

Por otro lado, la cepa M2 exhibió una notoria inhibición in vitro tanto en los cultivos duales como en los ensayos de metabolitos secundarios difusibles frente a todos los patógenos ensayados.

Estos hallazgos resaltan la importancia de seguir investigando la diversidad de los mecanismos de acción de *Trichoderma spp.* y su potencial para mejorar la producción agrícola de manera sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

Perspectivas

- Realizar los mismos experimentos a distintas temperaturas y rangos de PH para evaluar si hay un impacto en la actividad antifúngica de las cepas en estudio.
- Realizar nuevamente los ensayos de co-cultivos con plantas de *Arabidopsis*, agregando solución tampón al medio de cultivo.
- Llevar a cabo ensayos en tierra.
- Hacer ensayos de compatibilidad entre la cepa C1 y la cepa M2.
- Evidenciar los fenómenos de micoparasitismo por microscopía para observar la interacción directa entre las cepas C1 y M2 y los hongos fitopatógenos.
- Llevar a cabo ensayos tripartitos; antagonista-planta-patógeno para analizar la eficacia de ambas cepas en la protección de las plantas frente a los patógenos.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en los eluidos de las cepas C1 y M2 de *Trichoderma*, responsables de la actividad antifúngica.
- Sumar estudios de expresión génica mediante qPCR para determinar si las cepas M2 y C1 son capaces de inducir la expresión de genes relacionados con la defensa vegetal y, en consecuencia, activar mecanismos de resistencia en las plantas.

Anexo

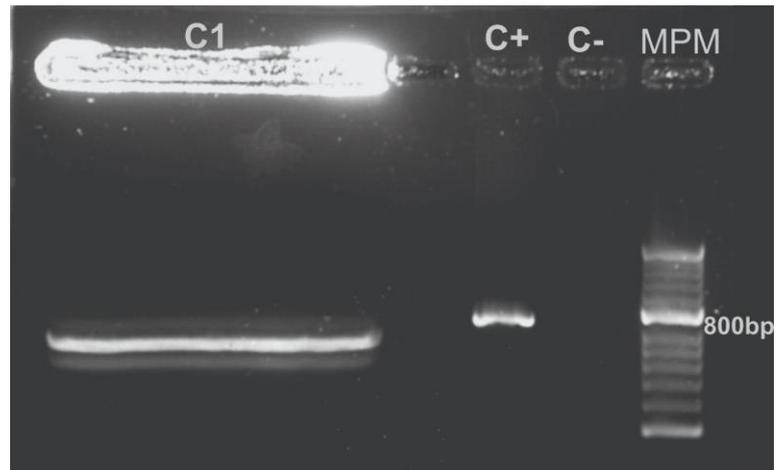


Figura S1. Electroforesis en gel de agarosa 2%, para los cebadores de *T. harzianum*. C1: ADN de la cepa C1, C+: control positivo (cepa conocida de *T. harzianum*), C-: control negativo (sin ADN) , MPM: marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen)

Bibliografía

Alwadai, A. S., Perveen, K., & Alwahaibi, M. (2022). The isolation and characterization of antagonist *Trichoderma* spp. from the Soil of Abha, Saudi Arabia. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(8), 2525. <https://doi.org/10.3390/molecules27082525>

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>

Baazeem, A., Almanea, A., Manikandan, P., Alorabi, M., Vijayaraghavan, P., & Abdel-Hadi, A. (2021). In vitro antibacterial, antifungal, nematocidal and growth promoting activities of *Trichoderma hamatum* FB10 and its secondary metabolites. *Journal of fungi*, 7(5), 331. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/jof7050331>

Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., & Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology*, 147(2), 779-789. doi: 10.1104/pp.108.118315

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, un hongo beneficioso para las plantas, mejora la producción de biomasa y promueve el crecimiento de raíces laterales a través de un mecanismo dependiente de auxina en *Arabidopsis*. *Fisiología Vegetal*, 149, 1579–1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>

Cordier, C., Edel-Hermann, V., Martin-Laurent, F., Blal, B., Steinberg, C., & Alabouvette, C. (2007). SCAR-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. *Journal of Microbiological Methods*, 68(1), 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.06.006>

Coulibaly, E., Pakora, A., Ako, A., Amari, D., N'Guessan, A., Kouabenan, A., Kone, D., & Djaman, J. A. (2022). Diversity of *Sclerotium rolfsii* antagonist fungi isolated from soils of the rhizosphere of tomato crops and identification of some antifungal compounds. *Heliyon*, 8(2), e08943. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08943>

DeBach, P., & Rosen, D. (1991). *Biological control by natural enemies* (2nd ed.). Cambridge University Press.

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P., & Henis, Y. (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*—Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73, 85–88.

Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., et al. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186-194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>

Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., et al. (2015). Volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*, 209, 1496-1512. <https://doi.org/10.1111/nph.13725>

Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. d. C., Fadji, A. E., Hyder, S., Babalola, O. O., & Santoyo, G. (2023). *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases—A review. *Plants*, 12(3), 432. <https://doi.org/10.3390/plants12030432>

He, D. C., He, M. H., Amalin, D. M., Liu, W., Alwindia, D. G., & Zhan, J. (2021). Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-economic consideration. *Pathogens*, 10(10), 1311. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101311>

Hermosa, M. R., Grondona, I., Díaz-Mínguez, J. M., Iturriaga, E. A., & Monte, E. (2001). Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of the *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soil borne fungal plant pathogens. *Current Genetics*, 38(6), 343-350. <https://doi.org/10.1007/s002940000173>

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(Pt 1), 17-25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>

Hewedy, O. A., Abdel Lateif, K. S., Seleiman, M. F., Shami, A., Albarakaty, F. M., & M El-Meihy, R. (2020). Phylogenetic diversity of *Trichoderma* strains and their antagonistic potential against soil-borne pathogens under stress conditions. *Biology*, 9(8), 189. <https://doi.org/10.3390/biology9080189>

Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Biodiversidad genética y metabólica de *Trichoderma* de Colombia y regiones neotrópicas adyacentes. *Genética Fúngica y Biología (Fungal Genetics and Biology)*, 46, 615–631. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.04.006>

Karlsson Green, K., Stenberg, J. A., & Lankinen, A. (2020). Making sense of Integrated Pest Management (IPM) in the light of evolution. *Evolutionary Applications*, 13(8), 1791-1805. <https://doi.org/10.1111/eva.13067>

Khan, R. A. A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B., & Li, Y. (2020). Bioactive Secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. *Microorganisms*, 8(6), 817. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>

Kredics, L., Chen, L., Kedves, O., Büchner, R., Hatvani, L., Allaga, H., Nagy, V. D., Khaled, J. M., Alharbi, N. S., & Vágvolgyi, C. (2018). Molecular tools for monitoring *Trichoderma* in agricultural environments. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1599. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01599>

Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., & Druzhinina, I. (2014). Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in different habitats. En V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina, & M. G. Tuohy (Eds.), *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 3-24). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1>

Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M., & Druzhinina, I. S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: From barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(10), 753-763. [10.1631/jzus.B0860005](https://doi.org/10.1631/jzus.B0860005).

La Spada, F., Stracquadiano, C., Riolo, M., Pane, A., & Cacciola, S. O. (2020). *Trichoderma* Counteracts the Challenge of *Phytophthora nicotianae* Infections on Tomato by Modulating Plant Defense Mechanisms and the Expression of Crinkler, Necrosis-Inducing Phytophthora Protein 1, and Cellulose-Binding Elicitor Lectin Pathogenic Effectors. *Frontiers in plant science*, 11, 583539. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583539>

Li, N., Alfiky, A., Wang, W., Islam, M., Nourollahi, K., Liu, X., & Kang, S. (2018). Volatile compound-mediated recognition and inhibition between *Trichoderma* Biocontrol Agents and *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2614. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02614>

Manganiello, G., Nicastro, N., Caputo, M., Zaccardelli, M., Cardi, T., & Pane, C. (2021). Functional hyperspectral imaging by high-Related vegetation indices to track the wide-spectrum *Trichoderma* biocontrol activity against soil-borne diseases of baby-leaf vegetables. *Frontiers in plant science*, 12, 630059. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.630059>

Manzar, N., Kashyap, A. S., Goutam, R. S., Rajawat, M. V. S., Sharma, P. K., Sharma, S. K., & Singh, H. V. (2022). *Trichoderma*: advent of versatile biocontrol agent, its secrets and insights into mechanism of biocontrol potential. *Sustainability*, 14(19), 12786. <https://doi.org/10.3390/su141912786>

Marra, R., Coppola, M., Pironti, A., et al. (2020). The application of *Trichoderma* strains or metabolites alters the olive leaf metabolome and the expression of defense-related genes. *Journal of Fungi*, 6(4), 369. <https://doi.org/10.3390/jof6040369>

Masi, M., Nocera, P., Reveglia, P., Cimmino, A., & Evidente, A. (2018). Fungal metabolite antagonists of plant pests and human pathogens: Structure-activity relationship studies. *Molecules*, 23(4), 834. <https://doi.org/10.3390/molecules23040834>

Matas-Baca, M. Á., Urías García, C., Pérez-Álvarez, S., Flores-Córdova, M. A., Escobedo-Bonilla, C. M., Magallanes-Tapia, M. A., & Sánchez Chávez, E. (2022). Morphological and molecular characterization of a new autochthonous *Trichoderma* sp. isolate and its biocontrol efficacy against *Alternaria* sp. *Saudi journal of biological sciences*, 29(4), 2620–2625. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.12.052>

Metwally, K., Tamara, G., Großkinsky, D. K., & Piechulla, B. (2015). *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology*, 6, 995. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00995>

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mala Mukherjee, M. M., & Schmoll, M. (Eds.). (2013). *Trichoderma: Biology and Applications*. CABI.

Mukhopadhyay, R., & Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: A beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egypt Journal of Biological Pest Control*, 30, 133. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>

Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., De Souza, J. T., Jimenez-Bremont, J. F., Ohkura, M., Stewart, A., & Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in plant science*, 8, 102. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>

Ottensschläger, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R. P., Sandberg, G., Ishikawa, H., et al. (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 2987–2991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437936100>

Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in Plant Science*, 8, Article 822. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00822>

Poosapati, S., Ravulapalli, P. D., Tippirishetty, N., Vishwanathaswamy, D. K., & Chunduri, S. (2014). Selection of high temperature and salinity tolerant *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Sclerotium rolfsii*. *SpringerPlus*, 3, 641. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-641>

Prabhakaran, N., Prameeladevi, T., Sathiyabama, M., & Kamil, D. (2015). Multiplex PCR for detection and differentiation of diverse *Trichoderma* species. *Annals of Microbiology*, 65(4), 1591-1595. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0998-5>

Rajani, P., Rajasekaran, C., Vasanthakumari, M. M., Olsson, S. B., Ravikanth, G., & Uma Shaanker, R. (2021). Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. *Microbiological Research*, 242, 126595. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126595>

Ramírez-Valdespino, C. A., Casas-Flores, S., & Olmedo-Monfil, V. (2019). *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1030. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01030>

Rather, I. A., Koh, W. Y., Paek, W. K., & Lim, J. (2017). The sources of chemical contaminants in food and their health implications. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 830. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00830>

- Rocha-Ramirez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B. A., & Herrera-Estrella, A. (2002). *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryotic Cell*, 1(4), 594-605. <https://doi.org/10.1128/EC.1.4.594-605.2002>
- Rubio, M. B., Hermosa, M. R., Keck, E., & Monte, E. (2005). Specific PCR assays for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichoderma harzianum* 2413 in soil. *Microbial Ecology*, 49(1), 25-33. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0171-3>
- Ruiz, R. A. (2011). Captura, actividad biológica e identificación de volátiles de la interacción *Trichoderma asperellum* - *Sclerotium rolfsii* sacc. [Master's thesis, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional]. Yautepec, Morelos, México.
- Samaniego, G., Ulloa, S., & Herrera, S. (1989). Hongos del suelo antagonistas de *Phymatotrichum omnivorum*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 8, 86-95.
- Sarrocchio, S., Mikkelsen, L., Vergara, M., Jensen, D. F., Lübeck, M., & Vannacci, G. (2006). Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed *Trichoderma virens* antagonistic strain. *Mycological Research*, 110(2), 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.08.005>
- Shoresh, M., Yedidia, I., & Chet, I. (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95(1), 76–84. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0076>
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., et al. (2020). *Trichoderma*: The "secrets" of a multitasking biocontrol agent. *Plants*, 9(6), 762. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>
- Stracquadanio, C., Quiles, JM, Meca, G., & Cacciola, SO (2020). Actividad antifúngica de metabolitos bioactivos producidos por *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma atroviride* en medio líquido. *Revista de hongos* , 6 (4), 263. <https://doi.org/10.3390/jof6040263>
- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 83-116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Tilman, D. (1999). Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 5995-6000. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.5995>
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular plant pathology*, 12(4), 341–354. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ścisiel, J. (2022). *Trichoderma*: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*, 9(11), 1963–1971. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1963>

Vinale, F., Krishnapillai, S., 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>

Viterbo, A., & Horwitz, B. A. (2010). Mycoparasitism. In K. A. Borkovich & D. J. Ebbole (Eds.), *Cellular and molecular biology of filamentous fungi* (pp. 807-819). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555816636.ch42>

Zhang, Y., Xu, S., Ding, P., Wang, D., Cheng, Y. T., He, J., Gao, M., Xu, F., Li, Y., Zhu, Z., Li, X., & Zhang, Y. (2010). Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 18220–18225. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005225107>