

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COORDINACION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

**PERFIL METABOLÓMICO DE *Trichoderma* spp. Y SU EFECTO
BIOESTIMULANTE Y ANTIFÚNGICO EN *Solanum lycopersicum* L.**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

FERNANDO CRUZ LÁZARO

Bajo la supervisión del Dr. Santos Gerardo Leyva Mir



APROBADA



Chapingo, Estado de México, mayo de 2026



**PERFIL METABOLÓMICO DE *Trichoderma* spp. Y SU EFECTO
BIOESTIMULANTE Y ANTIFÚNGICO EN *Solanum lycopersicum* L.**

Tesis realizada por **FERNANDO CRUZ LÁZARO** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:



DRA. MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

ASESOR:



DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

ASESOR:



DRA. ISABEL NATIVITAS LIMA

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	13
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
2.1 Cultivo de tomate	15
2.2 Patógenos fúngicos en tomate.....	16
2.3 Género <i>Fusarium</i>	16
2.4 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	16
2.5 Género <i>Trichoderma</i>	17
2.5.1 <i>Trichoderma</i> como agente de control biológico.....	17
2.5.2 Metabolitos de <i>Trichoderma</i>	18
2.5.3 Compuestos orgánicos volátiles	18
2.6 Análisis de metabolitos.....	19
2.7 Bioestimulación en plantas	19
2.8 Literatura citada	20
3. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE <i>Trichoderma</i> spp. Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN SEMILLAS DE <i>Solanum lycopersicum</i> L.	24
3.1 Resumen.....	24
3.2 Abstract	25
3.3 Introducción	26
3.4 Materiales y métodos	27
3.4.1 Reactivación de <i>Trichoderma</i> spp.....	27
3.4.2 Acondicionamiento del medio nutritivo para la obtención de fermentos. 28	
3.4.3 Obtención del inóculo de <i>Trichoderma</i> spp.....	28
3.4.4 Inoculación del medio nutritivo.....	28
3.4.5 Extracción de metabolitos de los fermentos de <i>Trichoderma</i> spp.....	28
3.4.6 Identificación de metabolitos mediante GC-MS	28
3.4.7 Actividad biológica de COV's de <i>Trichoderma</i> spp. en la germinación de <i>S. lycopersicum</i>	29
3.4.8 Evaluación del efecto bioestimulante de los COV's de <i>Trichoderma</i> spp.	29
3.4.9 Evaluación del efecto fungicida de los COV's de <i>Trichoderma</i> spp.....	29
3.5 Resultados y discusión	29
3.5.1 Perfil de metabolitos por disolvente de extracción	31

3.5.2 Perfil de metabolitos identificados en <i>Trichoderma</i> spp.	31
Ácidos grasos y derivados.....	31
Terpenoides.....	35
Compuestos fenólicos	37
Lactonas.....	37
Alcoholes.....	38
3.5.3 Germinación de <i>S. lycopersicum</i> en presencia de COV's de <i>Trichoderma</i>	38
3.5.4 Longitud total de <i>S. lycopersicum</i> en presencia de COV's de <i>Trichoderma</i>	38
3.5.5 Infección de <i>S. lycopersicum</i> L. en presencia de COV's de <i>Trichoderma</i>	40
3.6 Conclusiones.....	41
3.7 Literatura citada	41
4. TECNOLOGÍAS DE APLICACIÓN DE <i>Trichoderma</i> spp. EN <i>Solanum lycopersicum</i> L. INFECTADO CON <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	45
4.1 Resumen.....	45
4.2 Abstract	46
4.3 Introducción	47
4.4 Metodología	48
4.4.1 Aislados fúngicos	48
4.4.2 Genotipo de <i>S. lycopersicum</i> L.	49
4.4.3 Inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	49
4.4.4 Inóculo de <i>Trichoderma</i> spp.....	49
4.4.5 Desinfección del sitio experimental y materiales	50
4.4.6 Infección de <i>S. lycopersicum</i> con FOL.....	50
4.4.7 Solución nutritiva.....	50
4.4.8 Diseño experimental y aplicación de tratamientos vs FOL	51
4.4.9 Determinación de biomasa	51
4.4.10 Determinación del contenido nutrimental en tejido foliar.....	52
4.4.11 Evaluación del grado de infección de FOL.....	52
4.4.12 Análisis estadístico.....	53
4.5 Resultados y Discusión.....	53
4.5.1 Biomasa de raíz.....	53

4.5.2 Biomasa de tallo y parte aérea	53
4.5.3 Relación parte aérea/raíz (RPA/R).....	54
4.5.4 Nutrientes en tejido foliar	55
Nitrógeno	55
Fósforo	56
Potasio	56
Calcio y magnesio	56
4.5.5 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE).....	56
4.6 Conclusiones.....	58
4.7 Literatura Citada.....	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Abundancia relativa (%) de los principales compuestos identificados mediante CG-EM en extractos de fermentos de tres especies de <i>Trichoderma</i> realizados con acetato de etilo y hexano.	32
Cuadro 2. Peso seco (g) de raíz (PSR), tallo (PST), parte aérea (PSA) y relación parte aérea/raíz (RPA/R) de <i>Solanum lycopersicum</i> tratadas con y sin <i>Trichoderma</i> spp..	54
Cuadro 3. Contenido de nutrimentos en hojas maduras de <i>Solanum lycopersicum</i> infectadas con FOL, tratadas con y sin <i>Trichoderma</i> spp.....	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Evaluación de la actividad fungicida y de promoción del crecimiento de los cov's de *Trichoderma* spp. en semillas de *S. lycopersicum*. se colocaron por triplicado cada especie de trichoderma (izquierda) y un control sin microorganismo (derecha), las cámaras de germinación se sellaron (1). se incubó con luz natural a 32°C, las semillas germinaron en presencia de los cov's de trichoderma spp. (2). en los germinados se evaluó el porcentaje de infección, de germinación y la longitud total (3). 30
- Figura 2.** Cromatograma del extracto con acetato de etilo para el fermento de *t. atroviride* (a). la flecha indica el tiempo de retención (tr: 20.99) del metabolito trichoacorenol (4,8-dimetil-1-(1-metiletilo espiro-[4.5]dec-8-en-7-ol,-) espectro de masas del metabolito identificado (b) y de la biblioteca nist (c). 34
- Figura 3.** Cantidad de compuestos por grupo funcional de cada especie y disolvente de extracción identificados mediante cg-em. *t. viride* (tv), *t. atroviride* (ta) y *t. harzianum* (th). 35
- Figura 4.** Distribución de los compuestos identificados en ambos disolventes para cada especie de trichoderma. los datos en las intersecciones representan los compuestos en común entre especies. 36
- Figura 5.** Comparación de las medias obtenidas de cada tratamiento de la longitud total de los germinados. Agrupaciones de medias aplicando prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). 39
- Figura 6.** Comparación de las medias obtenidas del porcentaje de infección que presentaron las semillas. agrupaciones de medias aplicando prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). 39
- Figura 7.** Ensayo biológico de los COV's de *Trichoderma* para la germinación de *s. lycopersicum* siete días después de su establecimiento. semillas expuestas a COV's de trichoderma viride (izquierda). semillas testigo, no estuvieron expuestas a cov's de ningún otro microorganismo (derecha). 40
- Figura 8.** Escala de severidad de los síntomas causados por FOL en *S. lycopersicum*. sin síntomas aparentes, sana (0). leves síntomas de amarillamiento o manchas foliares pequeñas (1). amarillamiento predominante, disminución del

crecimiento y manchas cafés (2). manchas predominantes en tejido foliar y parches hundidos en tallo (3). marchitez predominante, tallo con síntoma de “ahogamiento”, crecimiento completamente pausado y necrosis en tejido (4). necrosis predominante en la planta, pérdida de turgencia en la mayoría de los tejidos (5). 52

Figura 9. Progreso de la enfermedad causada por FOL en *S. lycopersicum* durante de 21 días. los valores sobre las líneas corresponden al ABCPE, los valores con diferentes letras corresponden a diferencias con nivel de significancia de 5% según la comparación de medias de Tukey. 57

DEDICATORIAS

A mis padres Norma Lina Lázaro Rodríguez y Carlos Cruz Figueroa por su motivación, amor y apoyo incondicional.

A mi hermano Carlos Roberto por su respaldo y ser excelente consejero.

A Tania Roque por acompañarme en este proceso con amor y paciencia.

A mi abuela Paula por seguir siendo mi brújula moral.

A mis compañeros, Alan, Francisco, Marla, Alejandro y Lesly por su amistad y apoyo sincero en este proceso.

A Eligio, Alfredo, José Luis, Juan Pablo, Rafael, Francisco y Eduardo.

A mi familia y mis amigos que me acompañan cada día en esta experiencia.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el financiamiento otorgado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por seguirme formando académicamente.

Al Dr. Gerardo Leyva por su guía, consejo y apoyo para la realización de esta investigación.

A la Dra. Rosario García Mateos y al Dr. Jaime Sahagún por sus enseñanzas, consejos y correcciones.

Al Dr. Joel Pineda por sus consejos y apoyo para el establecimiento y evaluación de los ensayos experimentales.

Al personal de la UACH: Mariana Romualda Calzada Millan por su apoyo, consejo y experiencia compartida en los ensayos realizados en el Laboratorio de Micología agrícola del departamento de Parasitología Agrícola. Y a María Hayde Sánchez Tellez por su ayuda y la experiencia compartida en los ensayos realizados en el Laboratorio de Fisiología vegetal de Departamento de Suelos.

A la Coordinación de estudios de Posgrado del Departamento de Fitotecnia por la asignación de un cubículo de invernaderos para la investigación realizada.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Fernando Cruz Lázaró
Fecha de nacimiento	20 de junio de 1997
Lugar de Nacimiento	Córdoba, Veracruz
CURP	CULF970620HVZRZR09
Cedula Profesional	13703063



Datos académicos

Bachillerato	COBAEV 29 Sr. Gaspar Yanga
Licenciatura	Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

PERFIL METABOLÓMICO DE *Trichoderma* spp. Y SU EFECTO BIOESTIMULANTE Y ANTIFÚNGICO EN *Solanum lycoperscium* L.

La búsqueda de alternativas sustentables para reducir el uso de agroquímicos ha incrementado el interés en microorganismos con actividad antagonista de patógenos, como las especies del género *Trichoderma*. La presente investigación tuvo como objetivos: identificar metabolitos producidos por *Trichoderma* spp. mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), evaluar la actividad biológica de sus compuestos orgánicos volátiles (COV's) durante la germinación de tomate y determinar el efecto de diferentes tecnologías de aplicación de *Trichoderma* spp. en plantas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 (FOL). Se identificaron 89 metabolitos en GC-MS producidos por *Trichoderma viride*, *T. harzianum* y *T. atroviride*, pertenecientes principalmente a los grupos de terpenoides, compuestos fenólicos, lactonas, ácidos grasos y sus derivados. El trichoacorenol fue uno de los terpenoides más abundantes en las tres especies analizadas. Los ensayos biológicos realizados con COV's mostraron que *T. viride* y *T. harzianum* disminuyeron significativamente la incidencia de infecciones fúngicas en semillas de tomate, alcanzando valores de 13.5 % y 21 %, respectivamente, frente a 88.5 % del tratamiento control. Asimismo, los COV's promovieron el crecimiento de los germinados, incrementando su longitud total respecto al testigo. Adicionalmente, aplicaciones de *Trichoderma* spp. en plantas infectadas con FOL incrementaron significativamente la biomasa radical y aérea, además de reducir entre 47 y 53 % el progreso de la marchitez. Los resultados obtenidos evidencian el potencial de *Trichoderma* spp. y sus metabolitos como herramientas biotecnológicas para la promoción del crecimiento vegetal y el manejo sustentable de enfermedades en tomate.

Palabras clave: Control biológico, compuestos volátiles, CG-EM, marchitez por *Fusarium*.

GENERAL ABSTRACT

METABOLOMIC PROFILE OF *Trichoderma* spp. AND ITS BIOSTIMULANT AND ANTIFUNGAL EFFECTS ON *Solanum lycopersicum* L.

The search for sustainable alternatives to reduce the use of agrochemicals has increased interest in microorganisms with antagonistic activity against plant pathogens, particularly species of the genus *Trichoderma*. The objectives of this study were to identify metabolites produced by *Trichoderma* spp. using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC–MS), to evaluate the biological activity of their volatile organic compounds (VOCs) during tomato seed germination, and to determine the effect of different application technologies of *Trichoderma* spp. on tomato plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. A total of 89 metabolites were identified by GC–MS from *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, and *T. atroviride*, mainly belonging to terpenoids, phenolic compounds, lactones, fatty acids, and their derivatives. Trichoacorenol was one of the most abundant terpenoids in all three species. Biological assays with VOCs showed that *T. viride* and *T. harzianum* significantly reduced the incidence of fungal infections in tomato seeds, reaching values of 13.5 % and 21 %, respectively, compared to 88.5% in the control treatment. In addition, VOCs promoted seedling growth, increasing total seedling length compared to the control. Furthermore, applications of *Trichoderma* spp. to tomato plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 significantly increased root and shoot biomass and reduced the progression of vascular wilt by 47–53%. These results demonstrate the biotechnological potential of *Trichoderma* spp. and their metabolites as sustainable tools for plant growth promotion and disease management in tomato.

Keywords: Biological control, volatile compounds, GC-MS, *Fusarium* wilt.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los frutos que más se producen a nivel mundial. Los sistemas de producción de este cultivo han mejorado considerablemente en las últimas décadas; el uso de invernaderos, mejores sistemas de riego y el desarrollo de fertilizantes son factores que han incrementado la producción de tomate a nivel mundial (Costa & Heuvelink, 2018). Sin embargo, la producción de tomate implica una elevada inversión y un alto riesgo debido a la susceptibilidad por estrés fisiológico y a los ataques de plagas y enfermedades. Actualmente, la inocuidad alimentaria es un tema central en la producción de tomates. Las enfermedades de origen fúngico representan un alto riesgo para producir alimentos inocuos, ya que los hongos fitopatógenos pueden producir micotoxinas que afectan la salud de los consumidores. Los principales agentes causales de estas enfermedades en tomate pertenecen a los géneros *Pythium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis* y *Sclerotinia* (Jones, 2008; Rodrigues & Furlong, 2022).

Se han usado fungicidas sintéticos por años para mitigar las pérdidas en el cultivo de tomate por ataque de hongos, pero esta solución deja efectos negativos en el ambiente. Miles de millones de hectáreas de suelo cultivable a nivel mundial se encuentran con cierto grado de contaminación por pesticidas. Esto representa diversos riesgos para el agroecosistema como pérdida de biodiversidad y disminución de fertilidad de suelos. Asimismo, el uso indebido de estas sustancias puede resultar en el desarrollo de resistencia en patógenos, por ello, es necesario el estudio de alternativas para su control (Hough, 2021; Rodrigues & Furlong, 2022; Tang et al., 2021).

El uso de microorganismos que se asocian a plantas es una tendencia que fortalece los sistemas de producción agrícola que se encaminan a la sustentabilidad (Cavicchioli et al., 2019). Los biopesticidas microbianos son productos cuyo propósito es inocular microorganismos benéficos en los cultivos para prevenirlos del ataque de patógenos (Rao, 2022). Varias cepas de *Trichoderma* son utilizadas como agentes de control biológico actualmente. El primer reporte de este ascomiceto como antagonista de otros hongos se realizó en 1932 (Guzmán-Guzmán et al., 2023). Además de controlar hongos fitopatógenos, la aplicación de algunas especies de *Trichoderma* tienen efectos de interés para su uso en cultivos; la inducción de resistencia sistémica, la solubilización de

nutrientes en suelo, incluso la descomposición de materia orgánica por parte de *Trichoderma* spp. influye en el desarrollo de las plantas (Fiorentino et al., 2018).

Diversas especies de *Trichoderma* han sido evaluadas por su capacidad de controlar los hongos que afectan desde la raíz como aquellos pertenecientes a los géneros *Phytium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora* en cultivos hortícolas y de gramíneas (Guzmán-Guzmán et al., 2023; Manjunath, 2022). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) es un patógeno que causa la marchitez en tomate, primero penetra por las células epidérmicas de la raíz, después invade el tejido vascular de la planta y libera toxinas que causan síntomas como amarillamiento y necrosis del tejido vegetal. La dificultad para el control de FOL radica principalmente en la prolongada viabilidad de las estructuras de resistencia (clamidoporas) en el suelo, aún en ausencia del hospedero; su rápida colonización del tejido vascular también contribuye a un manejo complicado (Srinivas et al., 2019).

Cuando se comenzó a usar especies de *Trichoderma* para controlar patógenos se mencionó que la actividad de biocontrol era una consecuencia de la colonización y competencia por espacio y nutrientes contra los demás organismos presentes, atribuyendo gran parte de este fenómeno a modos de acción físicos (Kubiak et al., 2023). Sin embargo, *Trichoderma* spp. puede presentar diferentes modos de control contra patógenos, como micoparasitismo, competencia por recursos y antibiosis. Por ello, aún es necesario profundizar la investigación hacia los metabolitos producidos en las interacciones planta – *Trichoderma* – patógeno. Esto puede mejorar significativamente la forma en que estos agentes de control se aprovechen (Awal et al., 2024). La antibiosis y la inducción de resistencia en plantas son mecanismos de control mediados por metabolitos de este hongo benéfico. Regularmente, estos compuestos tienen más de un propósito, y las mezclas de sustancias emitidas pueden tener efectos diferentes de la aplicación de cada compuesto aislado, *Trichoderma* spp. puede emitir alcanos, terpenos, compuestos fenólicos, lactonas y alcoholes (Meena et al., 2017).

Según Reino et al. (2008), los metabolitos antibióticos de *Trichoderma* spp. se pueden clasificar en dos grandes grupos por su peso molecular; los volátiles de bajo peso molecular que pueden desplazarse y actuar en un sitio diferente de donde se emiten y de

alto peso molecular que sólo actúan en contacto con el organismo patógeno. Esto indica que la presencia activa de *Trichoderma* spp. en el suelo o sustrato cultivado, puede contribuir al desarrollo vegetal y a la prevención del ataque de patógenos.

Es importante explorar los perfiles metabolómicos de este hongo, ya que así pueden relacionarse los compuestos identificados de *Trichoderma* spp. con los diferentes efectos de su aplicación. Estos metabolitos son altamente reactivos y puede tener múltiples aplicaciones tanto en el sector agrícola como en el industrial y médico (Brock & Dickschat, 2011). En el tercer Capítulo del presente documento, se identificaron metabolitos de *Trichoderma* spp. mediante GC-MS además de evaluar el efecto fungicida y de promoción de crecimiento de compuestos volátiles de *Trichoderma* spp. en la germinación de *S. lycopersicum*. En el cuarto Capítulo se evaluó la infección en plantas de *S. lycopersicum* con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* con tratamientos que implican la aplicación de especies o consorcios de *Trichoderma* spp., en este caso se evaluó acumulación de biomasa, contenido nutrimental y severidad de la enfermedad.

Se plantea que las especies de *Trichoderma* spp. no solo ejercen su efecto de control sobre fitopatógenos mediante competencia o micoparasitismo, sino también mediante la producción de metabolitos bioactivos, particularmente compuestos orgánicos volátiles, capaces de influir en el crecimiento vegetal y en la inhibición de patógenos. En este contexto, el estudio del perfil metabolómico de *Trichoderma* spp. y la evaluación de sus efectos biológicos bajo diferentes condiciones de aplicación representan una estrategia clave para comprender y optimizar su uso en sistemas de producción agrícola sustentables.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cultivo de tomate

El tomate normalmente se cultiva en áreas templadas dentro de invernaderos, aunque también puede cultivarse en zonas subtropicales y a campo abierto; mundialmente es uno de los vegetales más consumidos y México es el principal exportador. Tanto la demanda como la producción de este fruto aumentan año con año, esto implica que la

industria del tomate tiene un alto impacto ambiental al demandar grandes cantidades de fertilizantes, agua, energía y biocidas. Por ello en la mayoría de los países productores se promueve el desarrollo de técnicas de producción más responsables, que propicien una menor huella ambiental (Costa & Heuvelink, 2018; Jones, 2008).

2.2 Patógenos fúngicos en tomate

Los hongos y oomicetos son los organismos que comúnmente causan enfermedades en plantas; desde ataques en hojas, flores y frutos hasta la raíz, estos patógenos pueden causar pérdidas importantes, sin las medidas de control pertinentes. Algunas de las enfermedades fúngicas más comunes que infectan a los tomates son causadas por microorganismos pertenecientes a los géneros *Cercospora*, *Fusarium*, *Oidium*, *Verticillium*, *Alternaria* y *Didymella* (Kumar et al., 2018).

2.3 Género *Fusarium*

Algunos miembros del género *Fusarium* son patógenos de plantas que causan marchitez, pudrición de plántulas, necrosis en raíces y tejido vascular, entre otros síntomas. Estos patógenos se encuentran en el suelo y atacan diversas especies de interés hortícola, iniciando su infección generalmente a través de la raíz (Srinivas et al., 2019). Los síntomas del ataque de *Fusarium* en plántulas de tomate incluyen una marchitez general y colapso. En plantas adultas de tomate suele comenzar con amarillamiento de hojas inferiores que se extiende posteriormente hacia arriba, termina provocando la necrosis de una parte de la planta o el colapso repentino de esta (Jones et al., 2008; Vallad et al., 2018).

2.4 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Fusarium oxysporum causa marchitez y daño vascular en más de 150 hospederos. Representa uno de los agentes patógenos más importantes del sector agrícola. Existen cepas especiales que atacan específicamente a ciertos hospederos, *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder and H.N. Hansen (FOL) causa marchitez, pudrición de tallo, corona y raíz en tomate (Srinivas et al., 2019). FOL

entra por la epidermis de las raíces, después infecta el tejido vascular volviendo ineficiente el transporte de agua y asimilados por xilema, resultando inicialmente en un desabasto de recursos causando marchitez y amarillamiento en secciones de la planta. Uno de los aspectos claves en la permanencia y control de este organismo es la indefinida viabilidad de la clamidospora cuando se encuentra en el suelo en reposo, aunque se encuentre ausente el hospedero. Los síntomas típicos del ataque de FOL incluyen epinastia en las hojas, seguida de marchitez y posterior amarillamiento; estos síntomas preceden a la muerte de la planta cuando el patógeno logra establecerse con éxito. Cuando la infección está completa, el hongo invade también tejido de parénquima, puede formar esporas y estructuras de resistencia en hojas y tallos para reproducirse, sin embargo, la propagación también puede darse a través de semillas (Srinivas et al., 2019; Vallad et al., 2018).

2.5 Género *Trichoderma*

Trichoderma es la forma asexual de un ascomiceto cuyo teleomorfo es nombrado *Hypocrea*. El género comprende aproximadamente 375 especies, producen conidios unicelulares en conidióforos agrupados que se forman sobre las fiálides, además puede producir clamidosporas con pared celular más gruesa. Los conidios pueden ser de color verde oscuro, hasta gris y marrón para algunas especies (Kubiak et al., 2023).

Según los análisis genéticos de *Trichoderma* spp. realizados por Steindorff et al. (2025) estos hongos son organismos predispuestos genéticamente para el micoparasitismo, además *Trichoderma* spp. se adaptó para relacionarse simbióticamente con plantas, particularmente especies arbóreas. Estos hongos también desarrollaron capacidad para degradar materia orgánica como mecanismo para obtener recursos.

2.5.1 *Trichoderma* como agente de control biológico

El término “control biológico” se refiere a la práctica de aplicar organismos o productos de su metabolismo para reducir los efectos de un patógeno, los productos de biocontrol son una alternativa para el uso de agroquímicos convencionales. Particularmente *Trichoderma* spp. ha sido reconocido como un agente de control biológico eficaz para hongos que causan enfermedades en plantas (Rush et al., 2021; Sood et al., 2020). El

60% de los biofungicidas registrados a nivel mundial, está basado en inóculos o metabolitos de *Trichoderma* spp. (Pokhrel et al., 2022).

Trichoderma spp. puede controlar enfermedades causadas por hongos en plantas, aunque también se ha reportado que su aplicación disminuye la incidencia de hongos patógenos foliares. Asimismo, se ha encontrado que algunas especies de *Trichoderma* pueden controlar ataques de nematodos en las raíces (Kaur et al., 2025)

Además de controlar patógenos que afectan las raíces con métodos directos (antibiosis y micoparasitismo), *Trichoderma* tiene la capacidad de influir en el equilibrio hormonal de planta para regular su crecimiento, ayuda en la absorción de nutrientes e induce mecanismos de defensa. Estos son mecanismos indirectos que ayudan a los cultivos a disminuir el ataque de patógenos (Alfiky & Weisskopf, 2021; Dutta et al., 2022).

2.5.2 Metabolitos de *Trichoderma*

Trichoderma spp. producen múltiples metabolitos con actividad antifúngica, antibacteriana, anticancerígena y diversas enzimas de importancia en el sector industrial. Esta es la principal razón por la que este hongo se ha usado con éxito en el control biológico de plagas, el control de *Trichoderma* sobre fitopatógenos se da mayormente por el efecto de la mezcla de compuestos emitidos por el hongo benéfico (Khan et al., 2020) Algunos de los metabolitos secundarios de este organismo afectan el crecimiento de las plantas y regulan poblaciones de microorganismos presentes en la rizosfera (Sood et al., 2020). Algunos de los metabolitos comúnmente identificados en el género *Trichoderma* incluyen terpenoides, lactonas, peptaiboles, compuestos fenólicos, alcanos, antracnonas, esteroides, enzimas, alcoholes, entre otros (Salwan et al., 2019). Se ha demostrado que varios compuestos como la 6-pentil-a-pirona, tienen múltiples efectos en plantas y microorganismos, por lo que la liberación de metabolitos puede ser multipropósito (Gualtieri et al., 2022).

2.5.3 Compuestos orgánicos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles (COV's) normalmente se difunden por suelo, aire o agua desde el punto de donde se originan gracias a su bajo peso molecular y alta presión de vapor (>0.01 kPa). La actividad biológica de estos compuestos es diversa y, en su

mayoría, tienen el objetivo de interactuar con otros organismos (Jiménez-Bremont et al., 2024).

2.6 Análisis de metabolitos

La metabolómica con enfoque no dirigido es un conjunto de técnicas y métodos para la búsqueda de todos los compuestos detectables, conocidos y desconocidos de un organismo. Diferentes técnicas cromatográficas, como la cromatografía de gases y la cromatografía líquida, junto con la espectrometría de masas, son útiles para el análisis de metabolitos en muestras complejas. Estas técnicas son útiles para identificar un gran número de metabolitos en mezclas que pueden provenir de cultivos microbianos, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es adecuada para el estudio de sustancias volátiles y polares (Khan et al., 2020).

Se han implementado diversos sistemas para la evaluación de la actividad biológica de compuestos volátiles de microorganismos, como mencionó Jiménez-Bremont et al. (2024) el objetivo de estos ensayos es mantener los COV's producidos por *Trichoderma* spp. en un sistema hermético donde se conserven y puedan tener efecto sobre otros patógenos o plantas.

Kaur et al. (2025) mencionaron que las fermentaciones de sustratos orgánicos de bajo costo como el arroz tienen la capacidad de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios.

2.7 Bioestimulación en plantas

Según du Jardin et al. (2020) un bioestimulante vegetal es cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el fin de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y/o las características de calidad del cultivo, independientemente de su contenido de nutrientes.

Las micorrizas y los hongos endófitos de plantas como *Trichoderma* spp. deben considerarse bioestimulantes ya que promueven diversos efectos en las plantas incluyendo una mayor tolerancia al estrés abiótico, una mayor eficiencia en el uso de

nutrientes, además del crecimiento y la morfogénesis de órganos. Aunque sus usos agrícolas actualmente se basan en el conocimiento sobre su uso como biopesticida. Los microorganismos aplicados a las plantas pueden tener una doble función: la de agente de control biológico y la de bioestimulante (du Jardin, 2015; Sood et al., 2020).

A pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos de acción de *Trichoderma* spp., aún existe información limitada sobre la relación directa entre los perfiles metabolómicos de distintas especies y sus efectos biológicos específicos en plantas y patógenos. Por lo tanto, resulta necesario integrar enfoques metabolómicos y ensayos biológicos que permitan establecer estas relaciones y contribuir al desarrollo de estrategias más eficientes y sustentables para el manejo de enfermedades en cultivos como el tomate.

2.8 Literatura citada

Alfiky, A., & Weisskopf, L. (2021). Deciphering *Trichoderma*–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi*, 7(1), Article 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>

Awal, M., Abdullah, N., Prismantoro, D., Dwisandi, R., Safitri, R., Mohd-Yusuf, Y., Suhaimi, N., & Doni, F. (2024). Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against *Fusarium* in horticultural crops. *Cogent Food & Agriculture*, 10(1), Article 2394685. <https://doi.org/10.1080/23311932.2024.2394685>

Brock, N., & Dickschat, J. (2011). Enantioselective synthesis of the unnatural enantiomers of the fungal sesquiterpenoids acorenone and trichoacorenol. *European Journal of Organic Chemistry*, (26), 5167–5175. doi: 10.1002/ejoc.201100688

Cavicchioli, R., Ripple, W., Timmis, K., Azam, F., Bakken, L., Baylis, M., Behrenfeld, M., Boetius, A., Boyd, P., Classen, A., Crowther, T., Danovaro, R., Foreman, C., Huisman, J., Hutchins, D., Jansson, J., Karl, D., Koskella, B., Welch, M. Martiny, J., Moran, M., Orphan, V., Reay, D., Remais, J., Rich, V., Singh, B., Stein, L., Stewart, F., Sullivan, M., van Oppen, M., Weaver, S., Webb, E., & Webster, N. (2019) Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 17(9), 569-586. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>

Costa, M. & Heuvelink, E. (2018). The Global Tomato Industry. In E. Heuvelink (Ed.), *Tomatoes* (2nd ed., pp. 1-26). CABI.

du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. doi: 10.1016/J.SCIENTA.2015.09.021

du Jardin, P., Xu, L., & Geelen, D. (2020). Agricultural functions and action mechanisms of plant biostimulants (PBs) In: D. Geelen & L. Xu (Eds). *The Chemical Biology of Plant Biostimulants* (pp. 1–30). doi: 10.1002/9781119357254.ch1

Dutta P., Deb, L., & Pandey, A. (2022) *Trichoderma*- from lab bench to field application: Looking back over 50 years. *Frontiers in Agronomy*, 4, Article 932839. doi: 10.3389/fagro.2022.932839

Fiorentino, N., Ventrino, V., Woo, S., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G., & Rouphael, Y. (2018). *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. *Frontiers in Plant Science*, 9, Article 743. doi: 10.3389/fpls.2018.00743

Gualtieri, L., Monti, M., Mele, F., Russo, A., Pedata, P., & Ruocco, M. (2022). Volatile organic compound (VOC) profiles of different *Trichoderma* species and their potential application. *Journal of Fungi*, 8(10), Article 989. <https://doi.org/10.3390/jof8100989>

Hough, R. (2021). A world view of pesticides. *Nature Geoscience*, 14(4), 183-184. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00718-z>

Jiménez-Bremont, J., Gonzalez-Perez, E., Ortega-Amaro, M., Madrigal-Ortiz, S., Duque-Ortiz, A., & Mendoza-Mendoza, A. (2024). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma*: Small molecules with biotechnological potential. *Scientia Horticulturae*, 325(9), Article 112656. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112656>

Jones, J. B. (2008). *Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden* (2nd ed.) CRC Press.

Kaur, J., Goswami, D., & Saraf, M. (2025). Response surface methodology: a comparative optimization of antifungal metabolite production by *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* using solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(12), 18723-18746. <https://doi.org/10.1007/s13399-025-06575-9>

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

Kubiak, A., Wolna-Maruwka, A., Pilarska, A., Niewiadomska, A., & Piotrowska-Cyplik, A. (2023). Fungi of the *Trichoderma* genus: future perspectives of benefits in sustainable agriculture. *Applied Sciences*, 13(11), Article 6434. <https://doi.org/10.3390/app13116434>

Kumar, S., Srinivasulu, A., & Babu, K. (2018). Symptomology of major fungal diseases on tomato and its management. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(6), 1817-1821.

Manjunath, G. (2022) Biorationals and biopesticides for disease management of horticultural crops. In R. Rajeshwari & V. Appanna (Eds.), *Biopesticides in Horticultural Crops* (pp. 12-19). CRC Press. doi: 10.1201/9781003243427

Meena, M., Swapnil, P., Zehra, A., Kumar, M., & Upadhyay, R. (2017). Antagonistic assessment of *Trichoderma* spp. by producing volatile and non-volatile compounds against different fungal pathogens. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50(13) 629-648. doi: 10.1080/03235408.2017.1357360

Pokhrel, A., Adhikari, A., Oli, D., Paudel, B., Pandit, S., & Tharu, B. (2022). Biocontrol potential and mode of action of *Trichoderma* against fungal plant diseases. *Acta Scientific Agriculture*, 6(10) 10-21. doi: 10.31080/ASAG.2022.06.1184

Rao, M. (2022) Innovations, commercialization and registration of biopesticides. In: R. Rajeshwari & V. Appanna (Eds.) *Biopesticides in horticultural crops* (pp. 1-11). CRC Press. doi: 10.1201/9781003243427

Rodrigues, M., & Furlong, E. (2022). Fungal diseases and natural defense mechanisms of tomatoes (*Solanum lycopersicum*): A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 122, Article 101906. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101906>

Rush, T., Shrestha, H., Meena G., Spangler, M., Ellis, J., Labbé, J., & Abraham P. (2021). Bioprospecting *Trichoderma*: A systematic roadmap to screen genomes and natural products for biocontrol applications. *Frontiers in Fungal Biology*, 2, Article 716511. doi: 10.3389/ffunb.2021.71651

Salwan, R., Rialch, N., & Sharma, V. (2019). Bioactive volatile metabolites of *Trichoderma*: An overview. In H. Singh, C. Keswani, M. Reddy, E. Sansinenea, C. García-Estrada, (Eds.) *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: Discovery and applications* (pp. 87-111). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_5

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: The “secrets” of a multitasked biocontrol agent. *Plants*, 9(6), Article 762. doi:10.3390/plants9060762

Srinivas, C., Devi, D., Murthy, K., Mohan, C., Lakshmeesha, T., Singh, B., Kalagatur, N., Niranjana, S., Hashem, A., Alqarawi, A., Tabassum, B., Abdallah, E., Nayaka, C., & Srivastava, R. (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>

Steindorff, A., Cai, F., Ding, M., Jiang, S., Atanasova, L., Baker, S., Rodrigues, J., Bayram, G., Brown, D., Chaverri, P., Chen, P., Chenthamara, K., Daum, C., Drula, E., Dubey, M., Brandström, M., Flatschacher, D., Ebner, T., Emri, T., Gao, R., Castro, R., Henrissat, B., Hermosa, R., Herrera-Estrella, A., Hinterdobler, W., Kainz, P., Karlsson, M., Kredics, L., Kubicek, P., Kuo, A., LaButti, K., Lipzen, A., Lorito, M., Mach, R., Manganiello, G., Marik, T., Martinez-Reyes, N., Mayrhofer-Reinhartshuber, M., Miskei, M., Moisan, M., Mondo, S.,

- Monte, E., Ng, V., Pang, G., Pangilinan, J., Peng, M., Piombo, E., Pócsi, I., Rahimi, M., Reddy, S., Riley, R., Sarrocco, S., Schmal, M., Schmoll, M., Szűcs, A., Woo, S., Yarden, O., Zeilinger, S., Zimmermann, C., Shelest, E., Tsang, A., Berka, R., de Vries, R., Grigoriev, I., & Druzhinina, I. (2026). Phenogenomics reveals the ecology and evolution of *Trichoderma* fungi for sustainable agriculture. *Nature Microbiology*, 11, 815–831. <https://doi.org/10.1038/s41564-026-02260-3>
- Tang, F., Lenzen, M., McBratney, A., & Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature Geoscience*, 14(4), 206-210. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00712-5>
- Vallad, G., Messelink, G., & Smith, H. (2018). Crop protection: Pest and disease management. In E. Heuvelink (Ed.), *Tomatoes*. (2nd ed., pp. 207-257) CABI.

3. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS DE *Trichoderma* spp. Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN SEMILLAS DE *Solanum lycopersicum* L.

Fernando Cruz-Lazaro¹, María del Rosario García-Mateos¹, Santos Gerardo Leyva-Mir² Isis Montalvo-López¹ y Jaime Sahagun-Castellanos¹

¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco 56230, Estado de México, México.

²Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco 56230, Estado de México, México.

3.1 Resumen

Trichoderma spp. es usado frecuentemente en la agricultura para controlar fitopatógenos. Dentro de los principales mecanismos de este organismo para controlar patógenos es común mencionar la competencia y colonización rápida del medio, sin embargo, se ha demostrado que gran parte de los beneficios de este hongo, están mediados por metabolitos. En este estudio se identificaron compuestos producidos por *Trichoderma viride*, *T. harzianum* y *T. atroviride* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), además de evaluarse la actividad biológica de sus COV's sobre semillas de *Solanum lycopersicum* L. Los metabolitos fueron obtenidos a partir de fermentación sólida en arroz y extraídos con hexano y acetato de etilo. Se identificaron 89 compuestos pertenecientes principalmente a terpenoides, ácidos grasos, compuestos fenólicos y lactonas. Entre los metabolitos de mayor abundancia destacaron trichoacorenol, ácido linoleico, ácido palmítico y 2-feniletanol. Asimismo, se detectaron compuestos previamente asociados con actividad antifúngica y promoción del crecimiento vegetal, como β -cariofileno y derivados de 6-pentil-2H-piran-2-ona. La actividad biológica de los COV's se evaluó en cámaras de germinación cerradas utilizando semillas de tomate sin desinfección previa. Los tratamientos con COV's de *T. viride* y *T. harzianum* redujeron significativamente ($p < 0.01$) la incidencia de infecciones fúngicas de 88.5 % en el control a 13.5 % y 21 %, respectivamente. Además, promovieron el crecimiento de los germinados, alcanzando longitudes medias de hasta 2.72 cm. Los resultados evidencian el potencial biotecnológico de los metabolitos de *Trichoderma* spp. para aplicaciones en agricultura sustentable.

Palabras clave: Terpenoides, lactonas, control biológico, bioestimulante, compuestos volátiles.

3.2 Abstract

Trichoderma spp. is frequently used in agriculture to control phytopathogens. While competition and rapid colonization of the environment are commonly mentioned among the main mechanisms this organism uses to control pathogens, it has been shown that many of the benefits of this fungus are mediated by metabolites. In this study, compounds produced by *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, and *T. atroviride* were identified using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and the biological activity of their volatile organic compounds (VOCs) on *Solanum lycopersicum* L. seeds were evaluated. The metabolites were obtained from solid-state fermentation in rice and extracted with hexane and ethyl acetate. Eighty-nine compounds were identified, primarily terpenoids, fatty acids, phenolic compounds, and lactones. The most abundant metabolites included trichoacorenol, linoleic acid, palmitic acid, and 2-phenylethanol. Compounds previously associated with antifungal activity and plant growth promotion, such as β -caryophyllene and 6-pentyl-2H-pyran-2-one derivatives, were also detected. The biological activity of the volatile organic compounds (VOCs) was evaluated in closed germination chambers using undisinfected tomato seeds. Treatments with VOCs from *T. viride* and *T. harzianum* significantly reduced ($p < 0.01$) the incidence of fungal infections from 88.5% in the control to 13.5% and 21%, respectively. Furthermore, they promoted germination growth, reaching average lengths of up to 2.72 cm. These results demonstrate the biotechnological potential of *Trichoderma* spp. metabolites for applications in sustainable agriculture.

Keywords: Terpenoids, lactones, biological control, biostimulant, volatile compounds.

3.3 Introducción

Trichoderma es un género de ascomicetos que se encuentra en cualquier tipo de suelo cultivable, son organismos saprofitos y se pueden aislar fácilmente de la rizosfera de muchas plantas cultivadas y silvestres (Brožová, 2004). El género incluye 375 especies identificadas (Gualtieri et al., 2022; Kubiak et al. 2023). Aproximadamente el 60 % de los biofungicidas registrados a nivel mundial contienen metabolitos o propágulos de alguna especie de *Trichoderma*. Ha sido usado por décadas para mitigar infecciones fúngicas en cultivos, ataques de nemátodos en las raíces e incluso para bioestimular plantas (Pokhrel et al., 2022).

La competencia por espacio y nutrientes es una de las estrategias de control de patógenos que más ha sido reconocida en hongos de este género. Una cepa que coloniza rápido el sustrato y hace uso eficiente de los recursos promete ser un buen agente de control biológico (Asad, 2022). Sin embargo, *Trichoderma* spp. cuenta con más mecanismos para suprimir a los patógenos; el micoparasitismo es el proceso en el que el hongo antagonista atrae, reconoce y finalmente ataca con enzimas los tejidos del hongo fitopatógeno. Por otro lado, la antibiosis se refiere a la liberación de sustancias que por sí solas pueden inhibir el crecimiento de patógenos (Kubiak et al., 2023; Pokhrel et al., 2022). En estos mecanismos se ven involucrados compuestos emitidos por *Trichoderma* con una o más funciones biológicas y que pueden ser producto del metabolismo primario (ej. aminoácidos y ácidos grasos) o secundario (ej. terpenos y compuestos fenólicos) del hongo (Asad, 2022; Salwan et al., 2019). Al menos 75 especies de este hongo han sido identificadas con alto potencial para micoparasitar fitopatógenos como *Fusarium Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Phytophthora* y *Pythium* (Pokrel et al., 2022; Salwan et al., 2019). *Trichoderma viride* y *Trichoderma harzianum* son de las especies más utilizadas en el control biológico actualmente por su capacidad antagonista (Kaur et al., 2024). A pesar de las virtudes del género *Trichoderma* el control biológico en la actualidad aún tiene diversos retos (Kubiak et al., 2023) que dificultan su adopción masiva en los sistemas de producción agrícola, por lo que el continuo estudio de sus mecanismos de antagonismo es necesario. Además de que la investigación en torno a los metabolitos producidos por este tipo de organismos puede resultar en la creación de nuevos fungicidas de origen biológico, más sustentables en la producción agrícola (Kumar et al., 2012).

Los compuestos orgánicos volátiles (COV's) son compuestos de bajo peso molecular que se evaporan con facilidad a temperatura ambiente, esto significa que pueden difundirse y actuar a cierta distancia del punto donde fueron originados (Hung et al., 2013). Las plantas, bacterias y hongos producen COV's para distintos propósitos como la comunicación o señalización intra e intergénero, sin embargo, la biosíntesis de COV's en hongos comprende un área de investigación poco explorada comparada con el de plantas y bacterias (Cavicchioli et al., 2019; Salwan et al., 2019).

Los COV's que generalmente producen los hongos son alcoholes, alcanos, lactonas, cetonas, terpenos y pironas. Algunos de estos compuestos son responsables de

desencadenar respuestas metabólicas en el organismo o cumplen funciones específicas, siendo así multipropósito, dependiendo del contexto del organismo en cuestión. Por ejemplo, el β -cariofileno producido por muchas plantas y solo algunos hongos ascomicetos, puede actuar como atrayente a polinizadores, activa mecanismos de defensa en las plantas y promueve su crecimiento. (Jiménez-Bremont et al., 2024). La biomasa de las cepas antagonistas de *Trichoderma* de las cuales se han identificado los COV's que producen, se obtienen a partir de fermentos líquidos o sólidos con diferentes técnicas (agitados o estáticos). Compuestos como esterres, alquenos, fenoles, alcoholes, monoterpenos y sesquiterpenos se han identificado con éxito en los últimos años (Gualtieri et al., 2022), contando con un registro de más de 370 compuestos para el género *Trichoderma* (Salwan et al., 2019).

El perfil volátil de *Trichoderma* cambia considerablemente entre especies y en consecuencia a la interacción con otros organismos. Compuestos como el 1-octen-3-ol y la 6-pentil-alfa-pirona se han logrado identificar con técnicas como cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS) y mediante ensayos biológicos se verifica la actividad de las sustancias emitidas (Gualtieri et al., 2022). Por ejemplo, Jiménez-Bremont et al. (2024) señalaron que existen métodos para determinar los efectos de los COV's de *Trichoderma* en diferentes organismos, el de mayor interés agronómico es entre plantas y el hongo, para esto se colocan semillas, frutas o plantas dentro de una cámara aislada donde también se encuentra una placa con una especie en crecimiento de *Trichoderma*, en ese caso puede observarse la actividad biológica de los compuestos emitidos por *Trichoderma*. La mayoría de los estudios realizados de este tipo se centra en evaluar la promoción o inhibición del crecimiento vegetal por los COV's emitidos de algún microorganismo; sin embargo, en el presente estudio se pretendió evaluar además la actividad fungicida en la germinación de semillas que contenían patógenos y no se les proporcionó tratamiento alguno de desinfección.

Esta investigación tuvo como objetivo identificar los compuestos emitidos por *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma atroviride* mediante GC-MS. Además, se observó y se evaluó la actividad fungicida y bioestimulante de los COV's emitidos por *T. viride*, *T. harzianum* y *T. atroviride* mediante un ensayo experimental donde se colocaron a germinar semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en un sistema cerrado que contenían estos mismos compuestos volátiles.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Reactivación de *Trichoderma* spp.

Las especies *T. viride*, *T. harzianum* y *T. atroviride* que se encontraban conservadas en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA e inmersas en aceite mineral se obtuvieron de la colección microbiológica del Laboratorio de Micología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Cada especie se sembró por separado en cajas Petri con medio de cultivo PDA y se dejó incubar a 25 °C por siete días para activar su metabolismo.

3.4.2 Acondicionamiento del medio nutritivo para la obtención de fermentos

Se empleó arroz como medio nutritivo para fermentar *Trichoderma* spp. y posteriormente extraer los metabolitos producidos. Primeramente, el arroz se sumergió en agua a punto de ebullición durante 3 min, lo que generó un aumento de humedad ~55 %. Después se colocaron 100 g de este arroz acondicionado en matraces Erlenmeyer de 500 mL, se taparon y posteriormente se llevaron a esterilizar a 120°C durante 20 min en una autoclave.

3.4.3 Obtención del inóculo de *Trichoderma* spp.

La solución de conidios que se usó para la inoculación del medio nutritivo se obtuvo de las placas Petri reactivadas de *Trichoderma* spp. Cada placa se lavó con 10 mL de agua destilada estéril + Tween 80 (0.01 %) y se separó del medio de cultivo con una espátula. Posteriormente se ajustó la concentración a 1×10^6 conidios/mL mediante el procedimiento de conteo de conidios en cámara de Neubauer. Para cada especie de *Trichoderma* se obtuvo una solución de conidios.

3.4.4 Inoculación del medio nutritivo

A un matraz con 100 g de medio nutritivo estéril, se le agregó 4 mL del inóculo de *T. viride* preparado previamente (1×10^6 conidios/mL), después se homogenizó y se mantuvieron tapados con algodón y Parafilm. Este procedimiento se repitió con *T. harzianum* y *T. atroviride* en matraces individuales. Por último, se dejaron incubar a 28 °C durante 8 d con ciclos de 12 h de luz.

3.4.5 Extracción de metabolitos de los fermentos de *Trichoderma* spp.

Para extraer los metabolitos de cada especie de *Trichoderma* se emplearon dos disolventes de diferente polaridad: hexano y acetato de etilo. A 50 g del fermento de *T. harzianum* se le adicionaron 100 mL de hexano, se incorporó el sustrato y el disolvente durante 3 min y después se sonicó la mezcla durante 10 min. Este procedimiento se repitió con acetato de etilo y también para *T. viride* y *T. atroviride* con ambos disolventes, obteniendo seis extractos en total. Para eliminar el acetato de etilo se utilizó un rotaevaporador, mientras que el hexano se evaporó a temperatura ambiente.

3.4.6 Identificación de metabolitos mediante GC-MS

El análisis de los extractos se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases (Agilent technologies-7890B) acoplado a un auto muestreador (7683B) y un detector selectivo de masas (5977A). En la separación cromatográfica se utilizó una columna HP5-MS (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m). El volumen de inyección de la muestra fue de 1 μ L. Las muestras se inyectaron en modo splitless a 280 °C. Las condiciones del horno fueron temperatura inicial a 60 °C por 1 min para incrementar a 6 °C/min hasta 270 °C, la cual se mantuvo por 1 min. El flujo de columna del gas acarreador fue de 1 mL/min de helio (pureza

99.999%). La línea de transferencia se mantuvo a 300 °C durante el análisis. Las temperaturas del cuadrupolo y de la fuente de ionización fueron de 150 y 230 °C, respectivamente. La adquisición de datos se realizó en modo impacto electrónico en un intervalo de m/z 50 – m/z 550 en modo SCAN. Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST 2011.

3.4.7 Actividad biológica de COV's de *Trichoderma* spp. en la germinación de *S. lycopersicum*.

Para mantener los compuestos volátiles producidos por *Trichoderma* spp. y evaluar su efecto en la germinación de *S. lycopersicum* se siguió la metodología propuesta por Lee et al. (2015, 2016) con modificaciones, cabe mencionar que las semillas se obtuvieron. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones. El sistema que se usó para evaluar actividad biológica de los COV's de *Trichoderma* spp. se ilustra en la Figura 1. En cajas Petri (250 x 15 mm) utilizadas como cámaras de germinación, se colocaron 50 semillas con 4 mL de agua destilada estéril y una placa de *T. atroviride*, cada elemento (semillas y hongo) se ubicaron en cajas Petri chicas (100 x 10 mm). Este procedimiento se replicó tres veces también para *T. viride* y *T. harzianum*. Las cámaras de germinación se incubaron por 7 d a 32°C. Cabe mencionar que al momento de establecer el experimento las placas de *Trichoderma* spp. usadas tenían 3 d desde su siembra.

No se realizó identificación de los microorganismos presentes en las semillas; por lo tanto, los resultados corresponden a la inhibición general de infecciones fúngicas asociadas al lote de semillas utilizado.

3.4.8 Evaluación del efecto bioestimulante de los COV's de *Trichoderma* spp.

Al término del experimento se midió la longitud total de los germinados (radícula + hipocótilo). Además, se realizó un conteo de semillas germinadas para calcular el porcentaje de germinación.

3.4.9 Evaluación del efecto fungicida de los COV's de *Trichoderma* spp.

Al término del experimento se evaluó en los germinados la presencia o ausencia de infecciones fúngicas y con esto se calculó el porcentaje de semillas enfermas. Los resultados obtenidos de este ensayo experimental se analizaron con el programa SAS studio 9.4 aplicando análisis de varianza ($p < 0.01$) y prueba de comparación medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

3.5 Resultados y discusión

Se identificaron 89 compuestos volátiles y no volátiles por GC-MS (Cuadro 1). La base de la mezcla de los metabolitos obtenidos son los terpenoides (30 identificados), los

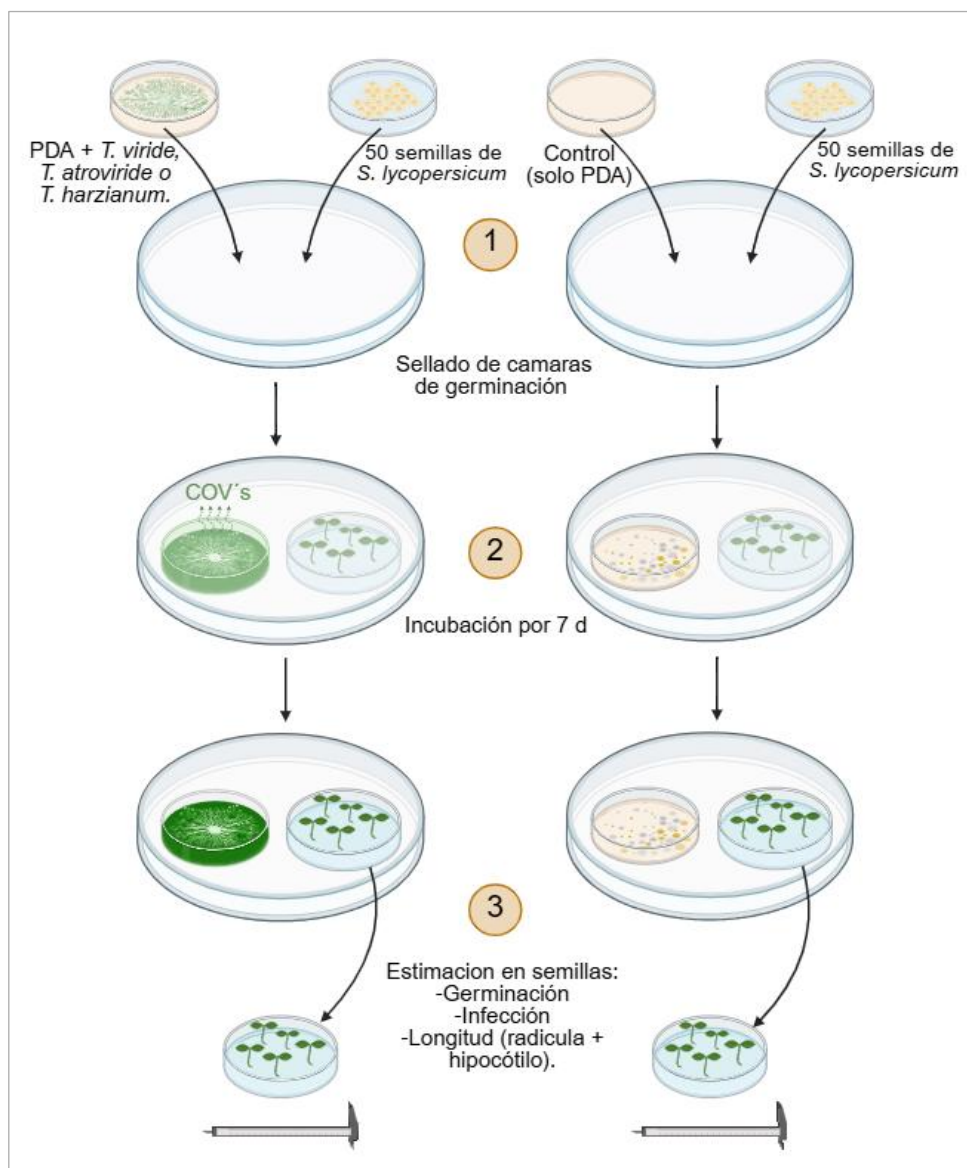


Figura 1. Evaluación de la actividad fungicida y de promoción del crecimiento de los COV's de *Trichoderma* spp. en semillas de *Solanum lycopersicum*. Se colocaron por triplicado cada especie de *Trichoderma* (izquierda) y un control sin microorganismo (derecha), las cámaras de germinación se sellaron (1). Se incubó con luz natural a 32°C, las semillas germinaron en presencia de los COV's de *Trichoderma* spp. (2). En los germinados se evaluó el porcentaje de infección, de germinación y la longitud total (3).

ácidos grasos y sus derivados (20 identificados) y compuestos fenólicos (9 identificados). Aunque también se detectaron lactonas y algunos alcoholes (5 identificados). Por la polaridad del extracto hexánico se identificaron compuestos no volátiles de carácter hidrofóbico, como algunos ésteres de ácidos grasos y esteroides, en contraste un mayor número de compuestos fueron extraídos con acetato de etilo. Un ejemplo del cromatograma de *T. atroviride* se muestra en la Figura 2.

3.5.1 Perfil de metabolitos por disolvente de extracción

La polaridad del hexano ayudó a identificar compuestos hidrofóbicos como ácidos grasos y sus ésteres; así como como en su mayoría terpenoides. Puede observarse un marcado aumento de la abundancia relativa en los principales ácidos grasos identificados; ácido linoleico (**63**) y el ácido palmítico (**60**). Sin embargo, los extractos realizados con acetato de etilo mostraron una mayor diversidad de compuestos terpenoides, fenólicos, lactonas y alcoholes de mayor polaridad que los anteriores, como se muestra en la Figura 3, en esta cada barra por su color agrupa a los metabolitos por su grupo funcional.

Lactonas como el, 3-acetil-4-hidroxi-6-metil-2H-piran-2-ona (**21**), 2-cumaranona (**14**), la anhidromevalolactona (**11**) y terpenos como el cedreno (**25**), β -sesquifelandreno (**33**), β -patchuleno (**26**), β -bisaboleno (**35**), y longifolene (**27**) se identificaron exclusivamente en los extractos realizados con acetato de etilo.

Además, la mayoría de los compuestos fenólicos y sus derivados resultaron con una abundancia mayor o exclusivamente identificados en los extractos con acetato de etilo. De la misma forma, alcoholes como el 1-octen-3-ol (**4**) y 1-undecanol (**54**) se identificaron exclusivamente de extractos de acetato de etilo.

3.5.2 Perfil de metabolitos identificados en *Trichoderma* spp.

T. viride destaca por el número de compuestos identificados cuyo fermento se procesó con acetato de etilo, alcanzando un total de 50 compuestos identificados, sin embargo, se identificaron entre 29 y 45 compuestos para *T. harzianum* y *T. atroviride*.

En las tres especies de *Trichoderma* se identificaron algunos metabolitos en común (24 identificados) (Figura 4). Asimismo, se puede observar en la figura el número de compuestos exclusivos por especie y otros en pares de estas, considerando ambos disolventes.

Ácidos grasos y derivados

En relación con los principales componentes según la abundancia relativa, se encuentran ácidos grasos tal como el ácido linoleico (**63**), el ácido palmítico (**60**) se identificaron ambos en las tres especies; de forma similar, un éster de ácido graso el 9,12-octadecadienoato de butilo (**72**) se identificó en las tres especies, aunque en menor proporción que los anteriores, siendo uno de los principales componentes. También fueron identificados otros ésteres de ácidos grasos como la monooleína (**77**), 2-monopalmitina (**71**) y linoleato de etilo (**68**), al respecto, Ruiz *et al.*, (2007) reportaron los lípidos de dos fermentos de especies de *Trichoderma* aisladas del mar mediante GC-MS. Asimismo, encontraron que tanto las especies terrestres como las marítimas tienen un contenido similar de lípidos en sus membranas, reconociendo a los ácidos oleico, linoleico y palmítico como componentes principales. En el presente estudio, el ácido linoleico y palmítico también constituyeron los principales ácidos grasos de las tres especies de *Trichoderma*.

Cuadro 1. Abundancia relativa (%) de los principales compuestos identificados mediante CG-EM en extractos de fermentos de tres especies de *Trichoderma* realizados con acetato de etilo y hexano.

No.	TR	Grupo	Compuesto	Disolvente de extracción					
				Hexano			Acetato de etilo		
				Especie de <i>Trichoderma</i>					
				TA	TV	TH	TA	TV	TH
1	3.275	Éster	butanoato de etilo	-	-	-	0.74	0.10	-
2	3.520	Aldehído	2-etil-2-butenal	-	-	-	-	-	0.41
3	4.770	Éster	diacetato 1,1-Etanediol	-	-	-	0.11	-	-
4	6.048	Alcohol	1-octen-3-ol	-	-	-	0.12	-	0.12
5	6.680	Aldehído	2-etil-hexenal	-	-	-	-	-	0.24
6	6.810	Ácido	ácido sórbico	-	-	-	-	0.14	-
7	7.448	Aldehído	benzeneacetaldehído	-	-	-	0.50	0.19	-
8	8.510	Fenol	o-guaiacol	-	-	-	-	-	0.25
9	9.039	Alcohol fenólico	2-feniletanol	0.99	1.64	0.51	2.81	5.28	-
10	10.010	Alcano	5-(2-metilpropil)-nonano	-	-	0.13	-	-	-
11	10.153	Lactona	anhidromevalolactona	-	-	-	0.53	0.67	0.91
12	10.480	Ac. graso	ácido caprílico	-	-	0.40	-	-	-
13	11.420	Furano	2,3-dihidro-benzofurano	-	-	-	-	0.16	-
14	11.787	Lactona	2-cumaranona	-	-	-	0.96	1.05	0.85
15	12.380	Ácido	ácido bencenoacético	-	-	-	-	0.28	-
16	12.430	Lactona	mevalonolactona	-	-	-	0.17	-	-
17	12.470	Ácido carboxílico	2-etil-4-metil-4,5-dihidro-1H-imidazol	-	-	-	-	0.38	-
18	13.110	Aldehído	(E,E)-2,4-decadienal	-	-	0.79	-	-	-
19	13.627	Fenólico	2-metoxi-4-vinilfenol	-	-	-	2.61	2.18	3.94
20	13.950	Amina	3-octanamina	-	-	-	-	0.13	-
21	14.755	Lactona	3-acetil-4-hidroxi-6-metil-2H-piran-2-ona	-	-	-	0.31	0.14	-
22	14.880	Fenol	2-propil-fenol	-	-	-	0.25	-	-
23	15.936	Terpenoide	β-cedreno	0.15	1.37	-	0.99	1.23	1.51
24	15.990	Terpenoide	1,4-cadinadieno	1.47	1.26	0.54	1.57	1.51	0.76
25	16.085	Terpenoide	cedreno	-	-	-	4.13	4.84	-
26	16.527	Terpenoide	β-patchuleno	-	-	-	0.25	-	-
27	16.605	Terpenoide	longifoleno (V4)	-	-	-	-	0.29	-
28	16.960	Terpenoide	α-longipineno	0.18	-	-	-	-	-
29	16.970	Terpenoide	tujopseno	-	-	-	-	0.20	-
30	17.083	Terpenoide	β-chamigreno	0.13	0.11	-	0.42	0.11	-
31	17.127	Terpenoide	acoradieno	0.60	0.46	0.56	1.58	1.72	1.26
32	17.188	Terpenoide	β-cariofileno	0.31	0.24	0.11	0.39	0.36	0.11
33	17.224	Terpenoide	β-sesquifelandreno	-	-	-	0.31	0.31	-
34	17.440	Terpenoide	β-cubebeno	0.12	0.13	-	-	0.31	-
35	17.734	Terpenoide	β-bisaboleno	-	-	-	0.14	0.12	-
36	17.882	Terpenoide	δ-elemeneno	0.42	0.31	-	0.58	0.45	0.15
37	18.868	Terpenoide	α-cedreno	-	-	-	0.43	0.35	-
38	19.140	Terpenoide	laureno	-	-	-	-	0.16	-
39	20.310	Terpenoide	τ-cadinol	-	0.11	-	-	-	-

40	20.530	Ácido	ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético	-	-	-	0.33	0.28	-
41	20.840	Terpenoide	5β,7βH,10α-eudesm-11-en-1α-ol	-	-	-	-	0.11	-
42	21.043	Terpenoide	trichoacorenol	21.40	17.52	7.41	19.45	13.43	7.26
43	21.190	Terpenoide	α-bisabolol	0.42	0.29	0.13	0.25	0.23	-
44	21.377	Terpenoide	1,4-trans-1,7-cis-acorenona	1.08	0.71	0.46	0.56	0.43	0.34
45	21.621	Lactona	tetrahidro-4-hidroxi-6-pentil-2H-piran-2-ona	-	-	0.17	-	0.56	0.36
46	21.670	Terpenoide	óxido B de α-bisabolol	0.20	-	-	-	-	-
47	21.680	Alcohol	tetrahidro-α,α,5-trimetil-5-(4-metil-3-ciclohexen-1-il)-, [2S-(2α,5β(R))]* 2-furanmetanol	-	0.17	-	-	-	-
48	21.820	Terpenoide	1,8-dimetil-8,9-epoxi-4-isopropil-espiro[4.5]decan-7-ona	-	-	0.11	-	-	-
49	22.217	Terpenoide	ledol	1.58	2.14	-	2.64	-	0.50
50	22.270	Terpenoide	copaeno	0.30	-	0.31	-	0.78	0.42
51	22.503	Ác. graso	ácido mirístico	0.61	-	0.98	-	-	0.23
52	24.028	Fenol	propenoato etil (2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-	0.13	-	-	0.17	0.50	-
53	24.227	Ác. graso	ácido pentadecanoico	0.64	-	1.17	-	-	0.70
54	24.530	Alcohol	1-undecanol	-	-	-	-	0.20	-
55	25.150	Aldehído	pentadecanal	-	-	-	0.10	-	-
56	25.270	Ác. graso	ácido oleico	-	-	-	0.16	-	-
57	25.560	Ác. graso	Z-11-ácido hexadenoico	-	-	-	-	-	0.91
58	25.733	Terpenoide	óxido de aromadendreno (isómero 2)	1.68	0.75	1.63	-	-	0.80
59	26.195	Amida	tetradecanamida	-	-	-	-	-	0.12
60	26.322	Ác. graso	ácido palmítico	17.30	21.80	30.77	-	8.05	17.53
61	26.390	Éster	hexadecanoato de etilo	-	-	-	-	1.31	-
62	26.710	Terpenoide	verticiol	0.60	-	-	-	-	-
63	29.452	Ác. graso	ácido linoleico	41.74	42.79	49.99	23.38	38.75	51.41
64	29.643	Amida	hexadecanamida	0.55	0.18	-	1.26	1.24	0.68
65	29.730	Alcohol	1-heptatriacotanol	-	1.28	-	0.98	0.60	-
66	29.988	Terpenoide	esclareol	1.04	-	-	1.36	-	0.27
67	30.613	Terpenoide	13β-metil-13-vinil-podocarp-7-en-3-ona	2.93	2.32	0.63	4.19	2.12	0.73
68	31.805	Éster	linoleato de etilo	-	-	-	0.94	0.75	-
69	31.898	Amida	9-octadecenamide, (Z)-	-	-	-	0.79	0.75	0.55
70	32.340	Alcano	tetracosano	-	0.32	-	-	-	-
71	32.370	Éster	2-monopalmitina	-	0.04	0.11	5.07	-	1.36
72	32.941	Éster	9,12-octadecadienoato de butilo	0.14	1.01	0.87	3.16	0.32	-
73	33.160	Éster	9,12-octadecenadienoate de i-propilo	-	0.23	-	-	-	-
74	33.268	Éster	9,cis.,11trans.-octadecadienoato de butilo	-	-	-	-	-	0.84
75	33.320	Éster	monolinolenina	-	-	-	-	1.56	-
76	33.350	Terpenoide	1,5,9-trimetil-12-(1-metiletil)-ciclotetradeca-4,8,13-trieno-1,3-diol	0.33	0.31	0.18	-	-	-
77	33.390	Éster	monooleína	0.22	0.29	-	4.13	2.09	-
78	33.580	Esteroides	4,4-dimetil-(3β)-androst-5-en-3-ol	0.66	-	-	-	-	-

79	33.585	Aldehído	2-[4-metil-6-(2,6,6-trimetilciclohex-1-enil)hexa-1,3,5-trienil]ciclohex-1-en-1-carbaldehído	0.22	0.68	-	-	0.62	-
80	33.640	Alcano	eicosano	-	-	0.19	-	-	-
81	33.670	Éster	estearato de glicidol	-	-	-	0.52	-	-
82	33.820	Éster	linoleato de isopropilo	0.12	0.16	0.19	-	-	-
83	34.320	Éster	1,2-dicarboxilato mono(2-etilhexilo)	-	-	-	-	0.20	-
84	34.330	Éster	1,2-dicarboxilato diisooctilo	0.21	-	-	-	-	-
85	35.350	Esteroides	β-sitosterol	-	-	-	7.51	-	-
86	35.920	Éster	fumarato de di(2-feniletíl)	-	-	0.15	-	-	-
87	35.935	Éster	oxalato de decilo 2-feniletíl	0.26	-	-	-	0.52	-
88	35.960	Éster	succinato de hexilo 2-feniletíl	-	0.32	-	-	-	-
89	36.044	Éster	monolinoleína	-	-	-	1.76	-	3.17

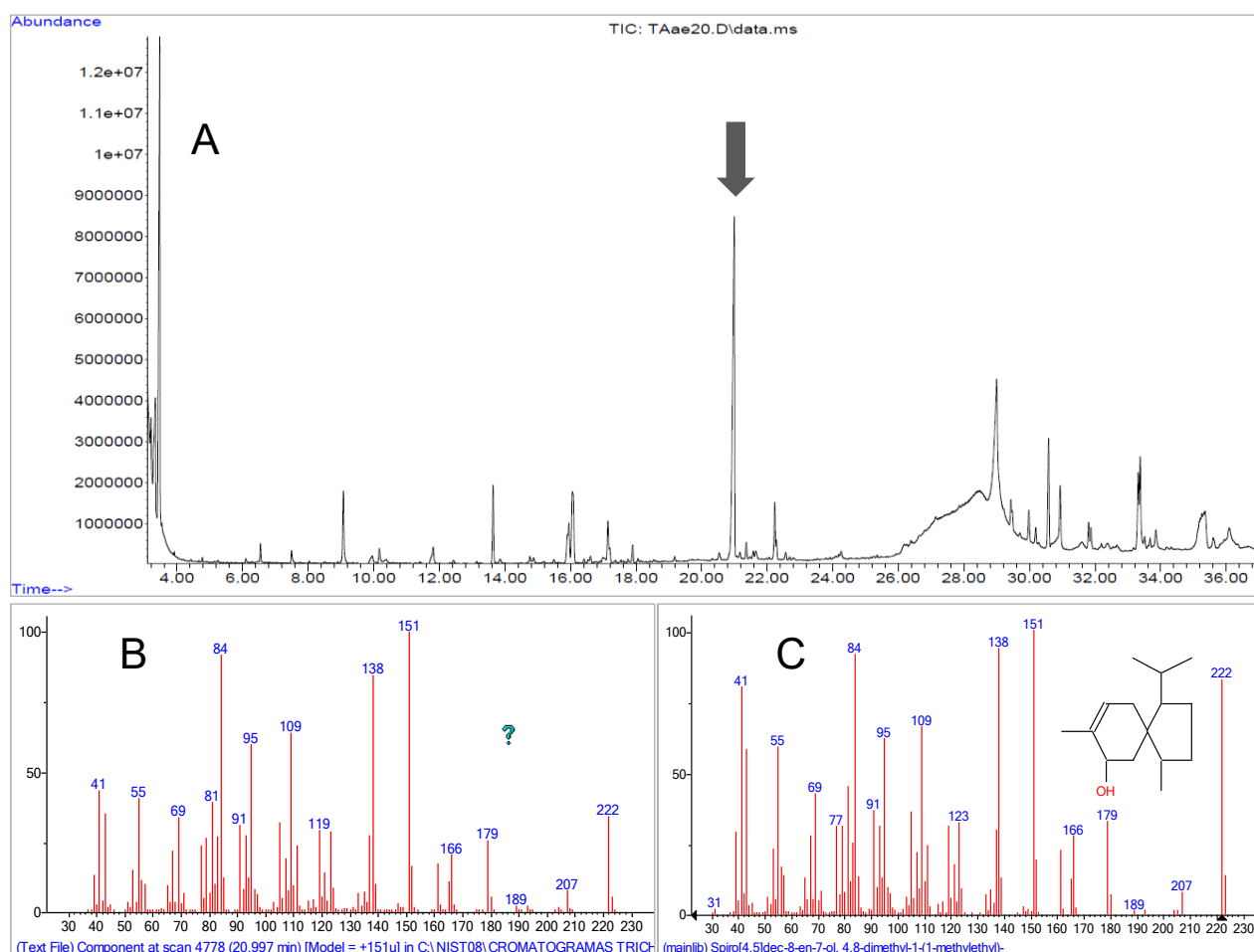


Figura 2. Cromatograma del extracto con acetato de etilo para el fermento de *Trichoderma atroviride* (A). La flecha indica el tiempo de retención (TR: 20.99) del metabolito trichoacorenol (4,8-dimetil-1-(1-metiletilo espiro-[4.5]dec-8-en-7-ol,-). Espectro de masas del metabolito identificado (B) y de la biblioteca NIST (C).

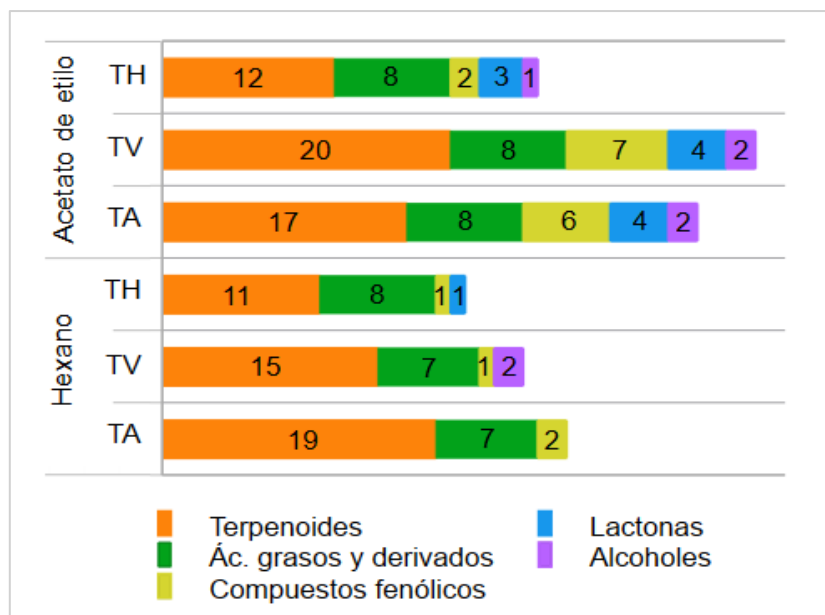


Figura 3. Cantidad de compuestos por grupo funcional de cada especie y disolvente de extracción identificados mediante CG-EM. *Trichoderma viride* (TV), *T. atroviride* (TA) y *T. harzianum* (TH).

Salwan *et al.* (2019) señalaron que un cultivo mixto de células fúngicas de *Trichoderma* puede producir hasta siete clases de lípidos en compartimentos intracelulares y extracelulares; a partir de estos ácidos grasos se pueden sintetizar alcoholes, alcanos y aldehídos. Esto coincide con lo obtenido, ya que al menos fueron identificados 20 ácidos grasos y algunos derivados y al menos se identificaron 7-8 por cada especie (Figura 3).

Terpenoides

El grupo más diverso de componentes identificados lo conforman los terpenos y sus derivados. El ledol (**49**), copaeno (**50**), α -bisabolol (**43**), β -cedreno (**23**), 13 β -metil-13-vinil-podocarp-7-en-3-ona (**67**), δ -elemeno (**36**) y β -cariofileno (**32**) fueron identificados exitosamente en las tres especies. Estos fueron de los componentes de mayor abundancia, además de un subgrupo de sesquiterpenos con estructura espiro[4.5] y espiro[5.5] como el acoradieno (**31**), trichoacorenol (**42**), 1,4-trans-1,7-cis-acorenona (**44**) y 1,4-cadinadieno (**24**) identificados en los fermentos de las tres especies. El trichoacorenol presente en las tres especies, fue el terpeno más abundante, en la Figura 2 se muestra el cromatograma, así como, su espectro de masas.

Respecto al trichoacorenol (**42**) Citron *et al.*, (2011) y Reino *et al.*, (2008) indicaron que el primer reporte de la identificación de este alcohol sesquiterpénico espirocíclico fue en 1995 en extractos de *Trichoderma koningii*. Sin embargo, el compuesto identificado y nombrado como trichoacorenol es idéntico estructuralmente al coccinol identificado previamente de *Fusidium coccineum*. Actualmente ambos nombres son aceptados para identificar este alcohol sesquiterpénico. Estos estudios también identificaron varios compuestos sesquiterpénicos que coinciden en un espirocentro, por su estructura estos compuestos sugieren la acción de la misma terpeno ciclasa, por lo que los compuestos

acoradieno (**31**), trichoacorenol (**42**) y 1,4-trans-1,7-cis-acorenona (**44**) identificados en *Trichoderma* spp. podrían pertenecer a la misma ruta de biosíntesis.

Wu et al. (2011) realizaron un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad biológica de varios sesquiterpenos relacionados con el acoreno en el crecimiento de hongos y bacterias de importancia agrícola y encontraron una inhibición del crecimiento en hongos fitopatógenos, aunque fue mayor el efecto en bacterias. En otros estudios (Karličić et al., 2021) se señaló al trichoacorenol como principal responsable de la actividad fungicida de *Trichoderma*.

El longifoleno (**27**), tujopseno (**29**), laureno (**38**), τ -cadinol (**39**) y el 5 β ,7 β H,10 α -eudesm-11-en-1 α -ol (**41**) fueron identificados exclusivamente en *T. viride*. El cedreno solo fue encontrado en fermentos de *T. viride* y *T. atroviride*; este compuesto representó uno de los principales componentes en la lista de esas dos especies. El esclareol (**66**) solo fue identificado en *T. harzianum* y *T. atroviride*.

Varios compuestos terpénicos identificados en el presente estudio han sido exitosamente vinculados con *Trichoderma* spp., como el β -cubebeno (**34**), β -chamigreno (**30**), β -bisaboleno (**35**), β -cedreno (**23**), β -sesquifelandreno (**33**), escaerol (**66**), 1,4-cadinadieno (**24**) (Citron et al., 2011; Lee et al., 2016; Li et al., 2019; Stoppacher et al., 2010; Stracquadanio et al., 2020) β -elemeno (**36**), laureno (**38**), tujopseno (**29**), (Li et al., 2019; Salwan et al., 2019), trichoacorenol (**42**) y acoradieno (**31**) (Citron et al., 2011; Karličić et al., 2021; Li et al., 2019).

Los terpenos y sus derivados se sintetizan a través de la ruta del ácido mevalónico en animales y hongos (Salwan et al., 2019). Los terpenos identificados producidos por

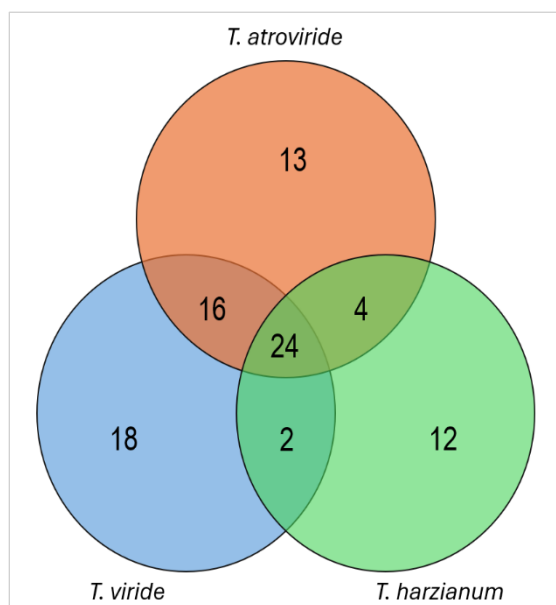


Figura 4. Distribución de los compuestos identificados en ambos disolventes para cada especie de *Trichoderma*. Los datos en las intersecciones representan los compuestos en común entre especies.

Trichoderma pueden ir desde simples monoterpenos hasta diterpenos cíclicos, sesquiterpenos y triterpenos como la viridina, normalmente tienen olores fuertes (Kaur et al., 2025; Yang et al., 2025). Regularmente el trichoacorenol es la base de la mezcla de terpenos en un extracto de COV's de *Trichoderma* spp. y se relaciona con actividad antifúngica (Karličić et al., 2021). Algunos de los compuestos que se identifican en este tipo de estudios se encuentran también en investigación metabolómica de plantas, estas los producen en situación de estrés tal es el caso del β -bisabolenol, β -sesquifelandreno y β -acoradieno (Lee et al., 2016).

Compuestos fenólicos

Otro grupo de importancia es el de los compuestos fenólicos y sus derivados tales como el 2-feniletanol (**9**) y 2-metoxi-4-vinilfenol (**19**), compuestos que se presentaron con mayor abundancia en las tres especies. *T. viride* destacó en relación con la producción de 2-feniletanol, con respecto a las demás especies por su mayor abundancia. El 2-feniletanol ha sido identificado ampliamente en microorganismos, particularmente en diversas especies de *Trichoderma*, además se ha reportado el efecto de inhibición en el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos, como *Alternaria* y *Fusarium* (Jiménez-Bremont et al., 2024; Sahvkiev et al., 2022; Stoppacher et al., 2010); también se ha identificado en mezclas de COV's emitidos por plantas con acción bactericida y fungicida (Sun et al., 2023).

Respecto al compuesto 2-metoxi-4-vinilfenol (**19**) identificado en el extracto de acetato de etilo en todas las especies de *Trichoderma*, no se encontraron reportes de su identificación en alguna especie del género *Trichoderma*. Sin embargo, un compuesto similar el m-metoxifenol, fue identificado en fermentos de *T. koningipsis*, pero no se ha reportado su actividad biológica (Li et al., 2019).

Compuestos fenólicos tales como el o-guaiacol (**8**) solo se encontraron en *T. harzianum*. El 2,3-dihidro-benzofurano (**13**) y el ácido bencenoacético (**15**) se identificaron exclusivamente en los extractos *T. viride*.

Lactonas

Las lactonas más sobresalientes (con respecto a su abundancia) de las identificadas fueron la anhidromevalolactona (**11**) y la lactona aromática 2-cumaranona (**14**) en los extractos con acetato de etilo de las tres especies de *Trichoderma*. Un derivado de 6-pentil-2H-piran-2ona- (conocida también como 6PP), la tetrahidro-4-hidroxi-6-pentil-2H-piran-2ona (**45**) fue identificada solamente en *T. viride* y *T. harzianum*.

Diversas lactonas presentan diferentes actividades reportadas como micotoxinas, antibióticos y antifúngicos. El grupo funcional que caracteriza a estos compuestos es de un éster cíclico. Además, puede hacerse una subclasificación dependiendo del metabolito del que se derivan, existen derivados de piridina, del furano y derivados de pirano (Kaur et al., 2025). Se han identificado lactonas en microorganismos asociados a diferentes e

importantes interacciones biológicas (Khan et al., 2020). En la Figura 4 se observó una mayor diversidad de lactonas identificadas con el disolvente acetato de etilo.

El 6-pentil-2H-piran-2-ona o 6PP es un metabolito característico del género *Trichoderma*, que se aisló por primera vez de *T. viride*. Este compuesto es el responsable del característico aroma a coco que emiten los fermentos de este hongo, también se le atribuyen propiedades fungistáticas y fungicidas contra diversos fitopatógenos (Daoubi et al., 2009; Li et al., 2019; Khan et al., 2020). El 6PP ha cobrado singular importancia, ya que fue uno de los primeros compuestos identificados en registrar múltiples respuestas biológicas, como efectos antimicrobianos y de promoción de crecimiento vegetal, estos efectos han sido demostrados a muy bajas concentraciones por lo que incluso se ha buscado la obtención de 6PP a partir de síntesis química para su uso como fungicida (Brock & Dickschat, 2011; Garnica-Vergara et al., 2015; Mishra et al., 2022; Lee et al., 2016). Adicionalmente, se ha demostrado que no todas las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de producir esta lactona (Andriamialisoa et al., 2010). Hasta el momento no se encontraron reportes de la síntesis de 6PP por *T. atroviride*.

Además, se identificaron dos posibles compuestos (**16** y **21**) relacionados con la 6-pentil-2H-piran-2ona-, que podrían ser parte de la misma ruta biosintética debido a la similitud de su estructura (Brock & Dickschat, 2011).

Alcoholes

Todos los alcoholes identificados en este análisis mostraron mayor abundancia en los extractos realizados con acetato de etilo, debido a su afinidad (por polaridad) con el acetato de etilo. El alcohol de mayor abundancia en las tres especies es el 1-octen-3-ol (**4**). Este compuesto se ha identificado en diversas familias de hongos, también es responsable del sabor de varios hongos comestibles y tiene actividad antifúngica. Además, se ha comprobado su efecto atrayente de ciertos insectos (Salwan et al., 2019). Este metabolito ha sido identificado previamente en *T. atroviride* y *T. viride* (Stoppacher et al., 2010).

3.5.3 Germinación de *S. lycopersicum* en presencia de COV's de *Trichoderma*

La germinación de semillas de tomate resultó entre 90 y 91.5 % para todos los tratamientos respecto al control; no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre tratamientos en relación con el testigo. La uniformidad de los datos de germinación indicó la viabilidad del lote de semillas usado, descartando interferencias por semillas dañadas.

3.5.4 Longitud total de *S. lycopersicum* en presencia de COV's de *Trichoderma*

Los germinados de *S. lycopersicum* que estuvieron en la cámara de germinación con los COV's de *T. viride* presentaron una media de 2.72 cm siendo el tratamiento que presentó la mayor promoción del crecimiento, seguido del tratamiento de COV's de *T. harzianum* con una longitud media de 2.52 cm (Figura 5). Estos tratamientos no presentaron

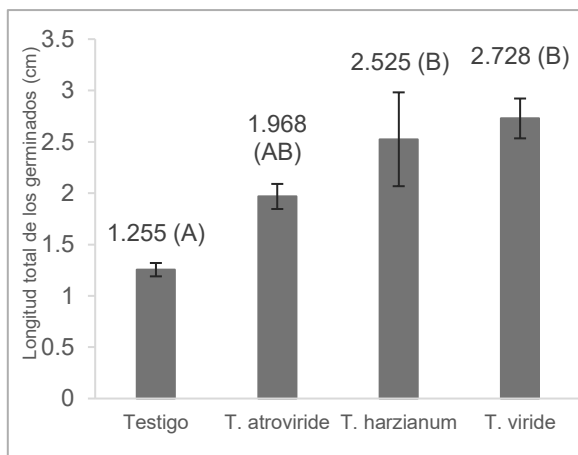


Figura 5. Comparación de las medias obtenidas de cada tratamiento de la longitud total de los germinados de *Solanum lycopersicum*. Agrupaciones de medias aplicando prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

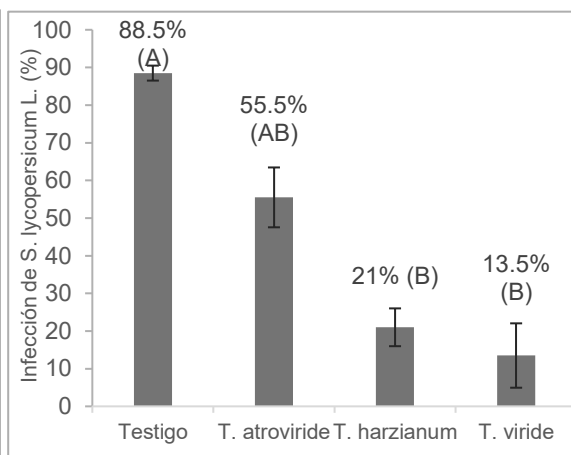


Figura 6. Comparación de las medias obtenidas del porcentaje de infección que presentaron las semillas de *Solanum lycopersicum*. Agrupaciones de medias aplicando prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

diferencias significativas ($p < 0.01$) entre sí, pero se diferenciaron del tratamiento control, cuyos germinados solo alcanzaron longitud media de 1.25 cm. Aunque el tratamiento de COV's de *T. atroviride* sí incrementó la longitud de los germinados (1.96 cm) no fue diferente significativamente a la del testigo ni a las de otras especies de *Trichoderma*.

Lee et al. (2016) realizaron un estudio similar con *Arabidopsis thaliana* y *S. lycopersicum*, donde los COV's de 20 cepas de 11 especies de *Trichoderma* estuvieron en contacto con *A. thaliana*. Se evaluó el peso seco de los germinados y el contenido de clorofila, encontrándose que la mezcla de COV's de las 11 cepas de *Trichoderma* promovieron el crecimiento vegetal, aumentado la biomasa entre un 37 a 41 % para *A. thaliana* y 41 % para *S. lycopersicum*. Aunque en dicho estudio la exposición de las semillas y germinados a los COV's fue mayor (21 días) al que se realizó en el presente estudio (7 días), lo cual coincidió con los aumentos de la longitud de las plantas de *S. lycopersicum*.

Al respecto, Álvarez-García et al. (2022) realizaron un estudio similar con semillas de trigo para evaluar los COV's emitidos por tres especies de *Trichoderma*, aunque con un sistema de contención de volátiles más amplio. Encontraron un aumento del peso seco de la parte aérea de las semillas que germinaron; sin embargo, algunas especies redujeron el crecimiento de raíces con respecto al testigo. En el mismo sentido, Lee et al. (2016) también encontraron que algunas cepas del hongo redujeron la biomasa de las plántulas.

En contraste a los estudios anteriores, en el presente estudio los COV's de las tres especies estimularon el crecimiento en raíces y tallo respecto al testigo (Figura 5).

Es importante señalar que los autores anteriores aplicaron tratamientos a la semilla previo al establecimiento del experimento, sin embargo, en el presente por el origen de la semilla y la intención de evaluar el control de posibles enfermedades contenidas en las semillas, no se realizó ningún tratamiento previo.

En la Figura 3 se observa la comparativa del mejor tratamiento de COV's en las semillas de *S. lycopersicum* en relación con el testigo; las semillas contenidas en el ambiente con COV's de *Trichoderma viride* mostraron mayor vigor y menos incidencia de enfermedades. Atribuibles a un posible efecto fungicida por la presencia de la mezcla de COV's emitidas por *Trichoderma* spp.

3.5.5 Infección de *S. lycopersicum* L. en presencia de COV's de *Trichoderma*

En la Figura 7 se observa que el mayor porcentaje de infección de semillas lo produjo el tratamiento control (sin microorganismos), con un promedio de 88.5 % de semillas enfermas. De acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$), el porcentaje del testigo fue diferente de los dos tratamientos en los cuales se mantuvieron en la misma cámara de germinación los COV's de las especies *T. harzianum* y *T. viride* con 21 y 13.5 % de semillas enfermas, respectivamente. Con los COV's de *T. atroviride* también se obtuvo una disminución de 55 % de semillas enfermas, pero no fue estadísticamente diferente al del testigo, ni a los de las otras dos especies de *Trichoderma*.

Cabe mencionar que la presente investigación contribuye a resultados que no se han reportado en relación con el efecto fungicida de los COV's de *Trichoderma* spp. en *S. lycopersicum*.

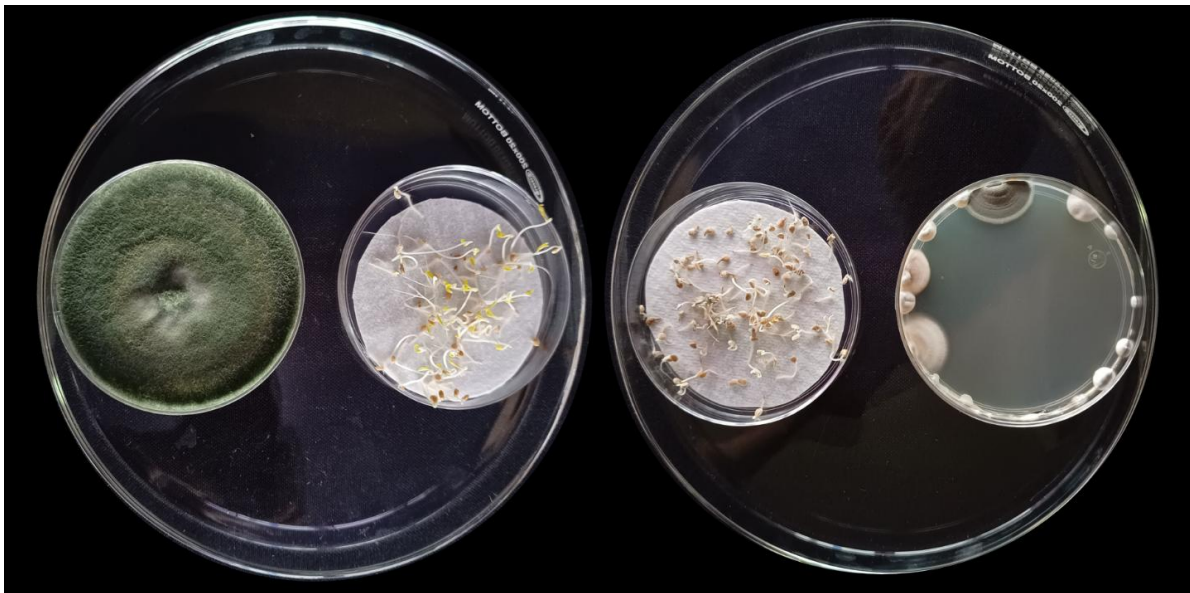


Figura 7. Ensayo biológico de los COV's de *Trichoderma* spp. en la germinación de *Solanum lycopersicum* siete días después de su establecimiento. Semillas expuestas a COV's de *Trichoderma viride* (izquierda). Semillas testigo, no estuvieron expuestas a COV's de ningún otro microorganismo (derecha).

3.6 Conclusiones

Las tres especies de *Trichoderma* estudiadas en el presente trabajo sintetizaron una mezcla de metabolitos biológicamente activos con la capacidad de interactuar en la germinación de *S. lycopersicum*. Además, estos metabolitos podrían ser extraídos con acetato de etilo y hexano a partir de un fermento sólido a base de arroz, como sustrato nutritivo, produciendo así una gran cantidad de terpenos, compuestos fenólicos y lactonas responsables del control de algunas enfermedades.

3.7 Literatura citada

Ahluwalia, V., Kumar, J., Rana, V., Sati, O., & Walia, S. (2015). Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity. *Natural Product Research*, 29(10), 914-920. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.958739>

Álvarez-García, S., Manga-Robles, A., Encina, A., Gutiérrez, S., & Casquero, P. (2022). Novel culture chamber to evaluate in vitro plant-microbe volatile interactions: Effects of *Trichoderma harzianum* volatiles on wheat plantlets. *Plant Science*, 320, Article 111286. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111286>

Andriamialisoa, Z., Giraud, M., Labia, R., & Valla, A. (2004). Chemical synthesis of 6-pentyl-2H-pyran-2-one: a natural antifungal biosynthesized by *Trichoderma* spp. *Chemistry and Ecology*, 20(1), 55-59. <https://doi.org/10.1080/02757540310001642670>

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

Brock, N., & Dickschat, J. (2011). Enantioselective synthesis of the unnatural enantiomers of the fungal sesquiterpenoids acorenone and trichoacorenol. *European Journal of Organic Chemistry*, (26), 5167–5175. doi: 10.1002/ejoc.201100688

Brozova, J. (2004). Mycoparasitic fungi *Trichoderma* spp. in plant protection. A review. *Plant Protection Science-UZPI*, 40(2), 63-74.

Cavicchioli, R., Ripple, W., Timmis, K., Azam, F., Bakken, L., Baylis, M., Behrenfeld, M., Boetius, A., Boyd, P., Classen, A., Crowther, T., Danovaro, R., Foreman, C., Huisman, J., Hutchins, D., Jansson, J., Karl, D., Koskella, B., Welch, M., Martiny, J., Moran, M., Orphan, V., Reay, D., Remais, J., Rich, V., Singh, B., Stein, L., Stewart, F., Sullivan, M., van Oppen, M., Weaver, S., Webb, E., & Webster, N. (2019) Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 17(9), 569-586. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>

Citron, C., Riclea, R., Brock, N., & Dickschat, J. (2011). Biosynthesis of acorane sesquiterpenes by *Trichoderma*. *Royal Society of Chemistry Advances*, 1(2), 290-297. doi: 10.1039/c1ra00212k

Daoubi, M., Pinedo-Rivilla, C., Rubio, M., Hermosa, R., Monte, E., Aleu, J. & Collado, I. (2009). Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6-pentyl-2H-pyran-2-one derivatives from *Trichoderma* spp. *Tetrahedron*, 65(25), 4834-4840. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.04.051>

Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L., & López-Bucio, J. (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive functioning. *New Phytologist*, 209(4), 1496-1512. <https://doi.org/10.1111/nph.13725>

Gualtieri, L., Monti, M., Mele, F., Russo, A., Pedata, P., & Ruocco, M. (2022). Volatile organic compound (VOC) profiles of different *Trichoderma* species and their potential application. *Journal of Fungi*, 8(10), Article 989. <https://doi.org/10.3390/jof8100989>

Hung, R., Lee, S., & Bennett, J. (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal ecology*, 6(1), 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.09.005>

Jiménez-Bremont, J., González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M., Madrigal-Ortiz, S., Duque-Ortiz, A., & Mendoza-Mendoza, A. (2024). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma*: Small molecules with biotechnological potential. *Scientia Horticulturae*, 325, Article 112656. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112656>

Karličić, V., Zlatković, M., Jovičić-Petrović, J., Nikolić, M., Orlović, S., & Raičević, V. (2021). *Trichoderma* spp. from pine bark and pine bark extracts: potent biocontrol agents against *Botryosphaeriaceae*. *Forests*, 12(12), Article 1731. <https://doi.org/10.3390/f12121731>

Kaur, J., Goswami, D., & Saraf, M. (2025). Response surface methodology: a comparative optimization of antifungal metabolite production by *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* using solid-state fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(12), 18723-18746. <https://doi.org/10.1007/s13399-025-06575-9>

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

Kubiak, A., Wolna-Maruwka, A., Pilarska, A., Niewiadomska, A., & Piotrowska-Cyplik, A. (2023). Fungi of the *Trichoderma* genus: future perspectives of benefits in sustainable agriculture. *Applied Sciences*, 13(11), Article 6434. <https://doi.org/10.3390/app13116434>

- Kumar, S. & Kaushik, N. (2012). Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. *Phytochemistry reviews*, 11(4), 507-522. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9271-y>
- Lee, S., Hung, R., Yap, M., & Bennett, J. (2015). Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth. *Archives of microbiology*, 197(5), 723-727. doi: 10.1007/s00203-015-1104-5
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., & Bennett, J. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal biology and biotechnology*, 3(1), 7. doi: 10.1186/s40694-016-0025-7
- Li, M., Li, G., & Zhang, K. (2019). Non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. *Metabolites*, 9(3), Article 58. <https://doi.org/10.3390/metabo9030058>
- Mishra, R., Mishra, M., Pandey, S., Saabale, P., & Naimuddin, R. (2022). Exploring the indigenous *Trichoderma* strains from pulses rhizosphere and their biocontrol potential against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea. *Indian Phytopathology*, 75(1), 273-278. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00416->
- Pokhrel, A., Adhikari, A., Oli, D., Paudel, B., Pandit, S., & Tharu, B. (2022). Biocontrol potential and mode of action of *Trichoderma* against fungal plant diseases. *Acta Scientific Agriculture*, 6(10) 10-21. doi: 10.31080/ASAG.2022.06.1184
- Reino, J., Guerrero, R., Hernández-Galán, R., & Collado, I. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 89-123. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9032-2>
- Ruiz, N., Dubois, N., Wielgosz-Collin, G., Du Pont, T., Bergé, J., Pouchus, Y., & Barnathan, G. (2007). Lipid content and fatty acid composition of a marine-derived *Trichoderma longibrachiatum* strain cultured by agar surface and submerged fermentations. *Process Biochemistry*, 42(4), 676-680. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.09.017>
- Salwan, R., Rialch, N., & Sharma, V. (2019). Bioactive volatile metabolites of *Trichoderma*: An overview. In H. Singh, C. Keswani, M. Reddy, E. Sansinenea, C. García-Estrada, (Eds.) *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: Discovery and applications* (pp. 87-111). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_5
- Shavkiev, J., Karimov, H., Turaeva, B., Azimova, N., Nazirbekov, N., & Khamidova, K. (2022). Some volatile metabolites produced by the antifungal-*Trichoderma asperellum* UZ-A4 micromycete. *International Journal of phytophathology*, 11(3), 239-251. doi: 10.33687/phytopath.011.03.4263
- Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2010). Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.03.011>

Stracquadanio, C., Quiles, J., Meca, G., & Cacciola, S. (2020). Antifungal activity of bioactive metabolites produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in liquid medium. *Journal of Fungi*, 6(4), Article 263. doi: 10.3390/jof6040263

Sun, S., Tang, N., Han, K., Wang, Q., & Xu, Q. (2023). Effects of 2-Phenylethanol on controlling the development of *Fusarium graminearum* in wheat. *Microorganisms*, 11(12), Article 2954. <https://doi.org/10.3390/microorganisms111229>

Wu, S., Zhao, L., Chen, Y., Huang, R., Miao, C., & Wang, J. (2011). Sesquiterpenoids from the endophytic fungus *Trichoderma* sp. PR-35 of *Paeonia delavayi*. *Chemistry & Biodiversity*, 8(9), 1717-1723. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000236>

Yang, M., Li, D., Deng, H., Li, W., Zheng, X., Gershenzon, J., Niu, X., Liu, Y., & Li, S. (2025). Noncanonical terpene cyclases for the biosynthesis of diterpenoids regulating chlamydospore formation in plant-associated *Trichoderma*. *Nature Communications*, 16(1), Article 7823. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-630>

4. TECNOLOGÍAS DE APLICACIÓN DE *Trichoderma* spp. EN *Solanum lycopersicum* L. INFECTADO CON *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Fernando Cruz-Lázaro¹, Santos Gerardo Leyva-Mir², Joel Pineda-Pineda³, María del Rosario García-Mateos¹, Jaime Sahagun-Castellanos¹.

¹Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco 56230, Estado de México, México.

²Departamento de Parasitología agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco 56230, Estado de México, México.

³Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5, Texcoco 56230, Estado de México, México.

4.1 Resumen

El uso intensivo de agroquímicos en la agricultura y sus riesgos han impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles para el manejo de enfermedades en cultivos hortícolas. En este estudio se evaluó el efecto de dos tecnologías de aplicación de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento, contenido nutrimental y severidad de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raza 3 en *Solanum lycopersicum* L. Se compararon los siguientes tratamientos: aplicación de *T. harzianum* (1×10^6 conidios mL⁻¹), un consorcio conformado por *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. viride*, un control comercial con acibenzolar-S-metil (Actigard®) y un testigo sin aplicación. Las plantas fueron inoculadas con FOL 35 d después de su siembra y cultivadas bajo condiciones de invernadero mediante un diseño experimental de bloques completos al azar. Se evaluaron biomasa de raíz, tallos y hojas, relación parte aérea/raíz, contenido nutrimental foliar y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). Los tratamientos con *Trichoderma* spp. incrementaron significativamente la biomasa radical y aérea respecto al testigo ($p < 0.01$), destacando el consorcio microbiano, que aumentó hasta 55 % la biomasa de raíz. Asimismo, ambos tratamientos redujeron considerablemente la severidad de la enfermedad, alcanzando disminuciones de 53 % y 47 % en el ABCPE para el consorcio y *T. harzianum*, respectivamente. Los resultados demuestran el potencial de *Trichoderma* spp. como estrategia biotecnológica sustentable para disminuir el impacto de FOL y favorecer el crecimiento de tomate bajo condiciones de estrés biótico.

Palabras clave: Bioestimulante, marchitez por *Fusarium*, consorcios microbianos, control biológico.

4.2 Abstract

The intensive use of agrochemicals in agriculture and their associated risks have driven the search for sustainable alternatives for disease management in horticultural crops. This study evaluated the effect of two *Trichoderma* spp. application technologies on the growth, nutrient content, and severity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) race 3 disease in *Solanum lycopersicum* L. The following treatments were compared: application of *T. harzianum* (1×10^6 conidia mL⁻¹), a consortium composed of *T. harzianum*, *T. atroviride*, and *T. viride*, a commercial control with acibenzolar-S-methyl (Actigard®), and a control with no application. Plants were inoculated with FOL 35 days after sowing and cultivated under greenhouse conditions using a randomized complete block design. Root, stem, and leaf biomass, shoot-to-root ratio, foliar nutrient content, and area under the disease progress curve (AUDPC) were evaluated. Treatments with *Trichoderma* spp. significantly increased root and shoot biomass compared to the control ($p < 0.01$), with the microbial consortium standing out, increasing root biomass by up to 55%. Both treatments also considerably reduced disease severity, achieving AUDPC reductions of 53% and 47% for the consortium and *T. harzianum*, respectively. These results demonstrate the potential of *Trichoderma* spp. as a sustainable biotechnological strategy to reduce the impact of follicular disease (FOL) and promote tomato growth under biotic stress conditions.

Keywords: Biostimulant, Fusarium wilt, microbial consortia, biological control.

4.3 Introducción

En las últimas décadas el uso de plaguicidas y fertilizantes sintéticos ha sostenido la producción de vegetales contribuyendo a la seguridad alimentaria; sin embargo, estos productos también representan riesgos para la salud humana y para el ecosistema. Actualmente el 65% del territorio que está destinado a la producción agrícola a nivel mundial presenta un riesgo significativo de contaminación por al menos una molécula de plaguicidas (aprox. 2.5 mil millones de hectáreas). En cuanto a los fertilizantes, a paso lento se ha construido una conciencia global sobre la huella ecológica que representa la producción y uso de estos, pero en el caso de los insecticidas, herbicidas y fungicidas no se concibe con la misma importancia (Tang et al., 2021; Hough, 2021). La amplia oferta de ingredientes activos de plaguicidas que encontramos en el mercado contribuye a la rotación de las moléculas aplicadas para evitar que los patógenos adquieran resistencia, sin embargo, su uso excesivo o inadecuado aún puede representar un riesgo para la salud de los consumidores de los vegetales tratados, así como también a quien aplica estos agroquímicos, además de contaminar el ecosistema (Barroso et al., 2025).

El sector agrícola se moderniza continuamente para resolver las problemáticas que afectan la calidad y rendimiento de los cultivos. Incluso las hortalizas de alto valor presentan pérdidas año con año por el ataque de patógenos que causan enfermedades. Muchos de estos organismos pertenecen al reino fungi (Kubiak et al., 2023). La búsqueda de soluciones tiende a promover las alternativas con menor impacto en el agroecosistema; tal como el uso de organismos antagónicos para mitigar el efecto de los fitopatógenos (Salwan et al., 2019). Según Cavicchioli et al., (2019) en los últimos años se ha desarrollado un interés en el uso y estudio de microorganismos asociados a plantas para aumentar la sostenibilidad agrícola.

Los agentes de control biológico han contribuido a que diversos esquemas de producción agrícola disminuyan el uso de agroquímicos, ofreciendo una solución menos nociva para el humano y más limpia ecológicamente. Diversos casos de éxito de control biológico se han documentado; uno de los más conocidos es el hongo *Trichoderma* que es capaz de controlar los daños de diversos organismos en plantas, principalmente otros hongos. Este ascomiceto comenzó a ser estudiado formalmente desde 1794 por Persoon, sin embargo, fue hasta 1932 que se describió por primera vez como “un hongo con la capacidad de parasitar a otros hongos” (Guzmán-Guzmán et al., 2023).

En una revisión Kubiak et al. (2023) señalaron que *Trichoderma* es un hongo ascomiceto, saprofito y cosmopolita con 375 especies identificadas, la mayoría de estas son de naturaleza asexual, usando conidios como principal estructura reproductiva, aunque también pueden producir clamidosporas. Los colores de sus colonias van de un tono verde oscuro hasta un tenue amarillo-grisáceo. Tiene comportamiento endofítico y simbiótico con una gran diversidad de plantas.

El teleomorfo de *Trichoderma* es conocido como *Hypocrea*, aunque varias especies de *Trichoderma* han perdido la capacidad de regresar a su estado sexual. Se teoriza que la

habilidad de *Trichoderma/Hypocrea* para parasitar otros hongos fue adquirida durante su proceso evolutivo. Primero estos organismos comenzaron a parasitar hongos que descomponían madera para después comenzar a explorar la madera como un sustrato nutritivo. Antes de ser un descomponedor de materia orgánica estos hongos ya estaban especializados en parasitar otros hongos y ésta es una de las razones por las que comenzó su aplicación y aprovechamiento como agente de control biológico (Druzhinina et al., 2011).

Las especies de *Trichoderma* que son usadas para biocontrol tienen la capacidad de establecerse en la rizosfera de las plantas, promover el crecimiento y de inducir la activación de mecanismos de defensa en estas. *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. virens*, y *T. viride* son de las especies más utilizadas en la agricultura actualmente (Gutiérrez-Moreno et al., 2025).

Los fitopatógenos fúngicos representan una disminución del rendimiento de los cultivos del 15-17 % (Dutta et al., 2022). El cultivo de tomate presenta pérdidas en rendimiento y calidad por ataque de patógenos de origen fúngico (Rashid, 2025). El uso de biopesticidas aumenta año con año y la oferta de estos productos se diversifica constantemente (Rajeshwari, & Appanna, 2021). Por ello es importante el constante estudio acerca de los métodos y tecnologías para aplicar estos microorganismos. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de aplicaciones individuales y en consorcio de *Trichoderma spp.* sobre el crecimiento, contenido nutrimental y severidad de la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate.

4.4 Metodología

4.4.1 Aislados fúngicos

Las especies que se usaron en este estudio fueron *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) raza 3, estos microorganismos se encontraban conservados en aceite mineral en el cepario del laboratorio de Micología agrícola, en el departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. *Trichoderma spp.* fueron aislados e identificados previamente de diferentes zonas agrícolas del país, mientras que FOL, se aisló de plantas infectadas en los invernaderos del Departamento de Fitotecnia. Para las pruebas posteriores, cada especie se reactivó separadamente en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) en cajas Petri (100 x 10 mm) y se dejó incubar a 25 °C, 48 h después se realizó siembra de punta de hifa en medio PDA para purificar cada microorganismo. Estas últimas placas se dejaron incubar durante 6 d a 25 °C para su posterior utilización en la obtención de los inóculos.

4.4.2 Genotipo de *S. lycopersicum* L.

Se trabajó con el híbrido 47/69 (susceptible a *Fusarium* spp.), las semillas fueron proporcionadas por el programa de mejoramiento genético de tomate de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.4.3 Inóculo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Con las placas de FOL se escaló a un sistema de fermentación líquida agitada. De esta forma se obtuvo el inóculo para infectar a *S. lycopersicum*. La fermentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 1 L donde se colocaron 500 mL de medio de cultivo Caldo dextrosa papa (PDB). Este medio se esterilizó previamente a 120 °C durante 20 min en autoclave. Para la siembra de cada matraz con medio de cultivo PDB se agregaron 5 fragmentos de 1 cm² de las placas purificadas que se obtuvieron anteriormente. Por último, el matraz se tapó con algodón y se llevó a una agitadora orbital a 120 rpm durante 8 d, con fotoperiodo de 12 h de luz.

Del fermento líquido se obtuvieron microconidios de FOL, la concentración de la suspensión se ajustó usando la técnica de conteo de estructuras en cámara de Neubauer. La concentración que se utilizó para la infección de *S. lycopersicum* fue de 1x10⁸ microconidios/mL.

4.4.4 Inóculo de *Trichoderma* spp.

Con las placas puras de *Trichoderma* spp. se escaló a un sistema de fermentación sólido estático. De esta forma se obtuvieron los conidios usados contra la infección de FOL en *S. lycopersicum*.

El medio nutritivo para la fermentación fue arroz acondicionado mediante una inmersión en agua a punto de ebullición durante 3 min, con esto se aumentó ~55 % la humedad del medio nutritivo. La siembra de este medio se realizó con una suspensión de conidios que se obtuvo a partir de las placas puras de *Trichoderma* spp. Estas placas se rasparon y enjuagaron con agua destilada estéril (ADE), y la concentración se ajustó mediante la técnica de conteo de estructuras en cámara de Neubauer.

Como contenedor de los fermentos se usaron matraces Erlenmeyer de 500 mL dentro se colocaron 100 g de medio nutritivo y después se llevaron a esterilizar en autoclave a 120 °C durante 20 min. Para *T. harzianum* se sembró el contenido de cada matraz con 4 mL de suspensión de conidios (1 x 10⁶ conidios/mL), después los matraces se cerraron con algodón y Parafilm para llevarlos a incubar durante 7 días a 28 °C, con periodos de luz natural de 12 h, el mismo procedimiento se repitió separadamente con *T. atroviride* y *T. viride*.

El medio nutritivo totalmente colonizado fue lavado con agua + Tween 80 (0.01%) y filtrado. Se ajustó la concentración de conidios mediante la técnica de conteo de estructuras en cámara de Neubauer. El primer tratamiento evaluado para el control de

FOL en *S. lycopersicum* consistió en la aplicación de un consorcio de *T. viride*, *T. harzianum* y *T. atroviride*. En este caso, la solución que se aplicó contenía partes iguales de cada especie (1×10^2 conidios/mL), alcanzando una concentración total de 1×10^6 conidios/mL. El segundo tratamiento evaluado consistió en la aplicación de una sola cepa; *T. harzianum*, pero concentrada a 1×10^6 conidios/mL. El punto de comparación no es la concentración ya que ambos tratamientos se igualan en cuanto al número de estructuras reproductivas aplicadas, sin embargo, en este experimento se contrastan los efectos de la tecnología de los consorcios microbianos.

4.4.5 Desinfección del sitio experimental y materiales

El ensayo experimental se realizó en los invernaderos asignados al posgrado de Horticultura del departamento de Fitotecnia, en la Universidad Autónoma Chapingo. Se usaron sales cuaternarias de amonio para desinfectar por dentro el invernadero, las charolas de germinación (poliuretano de 200 cavidades), herramientas y los contenedores de las plantas. En las charolas de germinación se usó una mezcla de peatmoss – agrolita (9:1), después se trasplantaron a contenedores de poliuretano de 1 L, el sustrato utilizado en estos contenedores fue tezontle – fibra de coco (4:1). Este sustrato se esterilizó mediante la inyección forzada de vapor, alcanzado $\sim 110^\circ\text{C}$ durante 60 min.

4.4.6 Infección de *S. lycopersicum* con FOL

Se sembró el híbrido de tomate en las charolas y las plántulas se desarrollaron durante 35 d. Posteriormente se trasplantaron a los contenedores grandes, al momento del trasplante se realizó la infección en las raíces; las plantas se extrajeron de las charolas y se lavó la raíz para remover el sustrato de germinación, después se realizaron cortes de aprox. 3 cm en las puntas de las raíces, posteriormente las raíces dañadas se sumergieron completamente dentro de una suspensión de micro conidios de FOL (1×10^8 micro conidios/mL), y se dejaron así durante 48 h, para finalizar el proceso de infección, se colocó cada planta en un contenedor de 1 L donde se cultivaron durante 40 días más.

4.4.7 Solución nutritiva

Los nutrientes que se aplicaron mediante el agua de riego se calcularon con base en la solución universal de Steiner con modificaciones. En la fase de germinación en charola se utilizó la solución nutritiva de Steiner con el $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ reducido en un 50 %. En la fase posterior a la infección en los contenedores grandes se utilizó la solución Steiner sin $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$. El volumen regado de solución hidropónica correspondía al de los riegos diarios según la etapa de crecimiento; en charola fue de 1-2 L/charola por día y se aplicó la solución nutritiva, en los contenedores grandes, se regó 30-40 mL/contenedor por día con la solución nutritiva (2.0 m/S) que se aplicaba 4 veces por semana.

Se consideró el siguiente análisis químico de agua para el diseño de las soluciones nutritivas y el cálculo de la cantidad de fertilizantes: $\text{Ca}=1.39$ meq/L, $\text{Mg}=1.23$ meq/L,

Na=1.58 meq/L, K=0.2 meq/L, HCO₂=2.5 meq/L, SO₄=1.55 meq/L, Cl=0.5 meq/L y B=0.05 ppm. Ambas soluciones nutritivas tienen menos fósforo que el indicado por Steiner, en los cálculos para equilibrar la solución nutritiva los meq restados en fósforo (H₂PO₄²⁻) se aumentaron en cloruro (Cl⁻).

4.4.8 Diseño experimental y aplicación de tratamientos vs FOL

Se estableció un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Todas las plantas recibieron el mismo manejo nutrimental. Todas las plantas fueron infectadas con FOL al momento del trasplante. Las plantas se cultivaron hasta 75 d después de su siembra. Los tratamientos evaluados fueron cuatro; A= dos aplicaciones en drench de *T. harzianum* (1 x 10⁶ conidios/mL), B= dos aplicaciones en drench de *T. harzianum* (1 x 10² conidios/mL) + *T. atroviride* (1 x 10² conidios/mL) + *T. viride* (1 x 10² conidios/mL), y dos tratamientos de control, C= dos aplicaciones foliares de Actigard® a dosis de 15 g/ha (control bioestimulante comercial) y D= Control sin aplicaciones de bioestimulantes o biofungicidas.

Actigard® es un producto categorizado como bioestimulante, activador de las defensas naturales de las plantas o inductor de resistencia, el i.a. es acibenzolar S metil. El producto tiene registro para aplicación en tomate y varias hortalizas y frutales más, indicado para controlar una diversa gama de microorganismos.

Las aplicaciones de los tratamientos se llevaron a cabo en dos momentos; 5 d antes del trasplante y 5 d después. El volumen de aplicación de los tratamientos que se usó correspondía al volumen de riego diario de solución nutritiva.

Los compuestos fenólicos y el contenido nutrimental en hojas se determinaron al término del ensayo experimental (75 d después de su siembra).

4.4.9 Determinación de biomasa

Se tomaron muestras de cuatro plantas por cada repetición (4) de los tratamientos (4) obteniendo un total de 64 unidades muestreadas. Se dividió la parte aérea de las raíces, cada raíz se colocó en bolsas de papel individuales. La parte aérea de cada planta se dividió en dos bolsas, una contuvo solo las hojas maduras, en la otra se almacenó el tallo y meristemo de la planta. Por último, se llevó a secar a 65 °C en un horno de circulación de aire.

La biomasa de la parte aérea se calculó con la suma del peso seco de las hojas maduras más el peso seco del tallo de cada planta. También se determinó la relación parte aérea/raíz. Esta relación se calculó obteniendo el cociente del peso seco de la parte aérea total entre el peso seco de la raíz de cada planta. La biomasa obtenida de la deshidratación de las hojas maduras se hizo por separado para que después se utilizaron en las determinaciones de nutrimentos en tejido vegetal.

4.4.10 Determinación del contenido nutrimental en tejido foliar

Las muestras de hojas maduras deshidratadas se usaron para determinar el contenido de nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, zinc, hierro, cobre, manganeso y sodio. Para todas las determinaciones primero se realizó una digestión húmeda ácida en relación 4:1 (ácido sulfúrico, ácido perclórico). El N total se determinó mediante arrastre de vapor Kjeldahl. El P se determinó por reducción con molibdovanadato de amonio mediante la medición de absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Genesys 150, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). K y Na se cuantificaron con un espectrofotómetro de emisión de flama (M410, Sherwood Scientific, Cambridge, UK). Ca, Mg, Zn, Fe, Cu y Mn se determinaron con un espectrofotómetro de absorción atómica (XplorAA Dual, GBC Scientific Equipment, Melbourne, Victoria, Australia).

4.4.11 Evaluación del grado de infección de FOL

La primera observación del grado de infección de FOL en plantas se realizó 14 d después de su trasplante, después se realizó periódicamente cada 7 días hasta los 75 días después de la siembra. Se realizaron análisis visuales de los principales síntomas de FOL atacando *S. lycopersicum*, primero se estableció una escala visual arbitraria que trata de integrar los síntomas característicos en las plantas, en esta escala de severidad se tomó en cuenta síntomas como marchitez de hojas y tallos, amarillamiento de folíolos, disminución del crecimiento, manchas oscuras y necrosis en hojas y tallo (Figura 8). Se realizaron tres evaluaciones cada 7 días a partir del último tratamiento aplicado. Para



Figura 8. Escala de severidad de los síntomas causados por FOL en *Solanum lycopersicum*. Sin síntomas aparentes, sana (0). Leves síntomas de amarillamiento o manchas foliares pequeñas (1). Amarillamiento predominante, disminución del crecimiento y manchas cafés (2). Manchas predominantes en tejido foliar y parches hundidos en tallo (3). Marchitez predominante, tallo con síntoma de “ahogamiento”, crecimiento completamente pausado y necrosis en tejido (4). Necrosis predominante en la planta, pérdida de turgencia en la mayoría de los tejidos (5).

integrar estos datos se transformaron a porcentaje, después se graficaron y se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE).

4.4.12 Análisis estadístico

Se realizaron dos ensayos experimentales independientes en el mismo sitio, durante la primavera y parte del verano del 2025. Dado que los resultados de ambos experimentos no difieren significativamente entre sí, se analizaron los datos como conjunto. Para analizar los datos se usó el software SAS versión 9.4 aplicando análisis de varianza ($p < 0.01$) y prueba de agrupación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

4.5 Resultados y Discusión

4.5.1 Biomasa de raíz

En el Cuadro 1 se puede observar que las plantas que tuvieron los tratamientos A y B, los cuales son ambas tecnologías de aplicación de *Trichoderma* spp. tuvieron raíces significativamente más grandes ($p < 0.01$) comparadas con el control comercial (C) y el control sin aplicaciones (D). Cuando se aplicó *T. harzianum* solo (A) aumentó la biomasa de las raíces un 47% respecto al testigo sin aplicación, mientras que el consorcio de tres especies de *Trichoderma* (B) aumentó en 55% la biomasa de raíces con respecto al control sin aplicaciones de bioestimulantes.

Battaglia et al. (2024) reportaron aumentos de la biomasa de raíces en *Glycine max* L. aplicando cepas separadas de *T. harzianum* en diferentes condiciones de sequía obtuvieron aumentos en el peso seco de raíces de 60 a 110 %. Estos autores también reportan “una importante modificación de la arquitectura de raíces”.

4.5.2 Biomasa de tallo y parte aérea

En el tallo también se presentó un aumento de la biomasa en los tratamientos que contenían *Trichoderma* spp. (A y B). En el Cuadro 2 se aprecia que se diferenciaron significativamente solo del control comercial (C). El tratamiento A, aumentó 24% la acumulación de biomasa en tallo respecto al control sin aplicaciones de bioestimulante (D), mientras que cuando se aplicó el consorcio de *Trichoderma* spp. (B) la biomasa aumentó un 27% respecto al control sin aplicaciones de bioestimulante (D).

Li et al. (2017) realizaron un estudio similar infectando plantas de tomate con *F. oxysporum* f. sp. FOL146. Los tratamientos consistieron en una cepa de *T. asperellum* aplicada antes y después de la infección de FOL. Todas las plantas de tomate que se trataron con *T. asperellum* mostraron un aumento significativo del peso seco total respecto a las del control (solo con infección de FOL).

Diversas especies de *Trichoderma* han sido identificadas con cierta capacidad para promover el crecimiento vegetal. La principal razón de esto es la producción de

Cuadro 2. Peso seco (g) de raíz (PSR), tallo (PST), parte aérea (PSA) y relación parte aérea/raíz (RPA/R) de *Solanum lycopersicum* tratadas con y sin *Trichoderma* spp.

Trat.	PSR	PST	PSA	RPA/R
A	1.45a	1.82a	3.42a	2.39b
B	1.48a	1.86a	3.30a	2.37b
C	0.55b	0.89b	2.82a	3.68a
D	0.95b	1.46ab	1.73a	2.39ab
CV (%)	17.28	22.73	27.58	18.61

A= *Trichoderma harzianum* (1×10^6 conidios/mL), B= *T. harzianum* (1×10^2 conidios/mL) + *T. viride* (1×10^2 conidios/mL) + *T. atroviride* (1×10^2 conidios/mL), C=Control comercial (Actigard®), D=Control sin aplicaciones de bioestimulantes ni microorganismos, CV= coeficiente de variación.

Los valores con diferente letra dentro de la misma columna representan diferencias significativas entre las medias analizadas con nivel de significancia de 5% según la comparación de medias de Tukey.

metabolitos por parte del hongo que tienen actividad directa en el metabolismo de la planta. Se ha comprobado que *T. harzianum*, *T. virens*, *T. longibrachiatum* y *T. spirale* tienen la capacidad de producir fitohormonas como auxinas y giberelinas, estos compuestos son claves en el efecto de promoción del crecimiento tanto en raíces como la parte aérea de la planta (Gutiérrez-Moreno et al., 2025).

Se han estudiado numerosas especies del género *Trichoderma* y su interacción con especies vegetales. Actualmente se sabe que, desde el proceso de colonización de raíces por parte del hongo, ambas especies se reconocen y promueven diversas respuestas, por ejemplo, la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos, la modificación y refuerzo de las paredes celulares vegetales y la modulación de los mecanismos de defensa vegetal mediados por fitohormona (Alfiky & Weisskopf, 2021).

4.5.3 Relación parte aérea/raíz (RPA/R)

Esta variable expresa como las plantas distribuyen su biomasa. La distribución de la biomasa de las plantas responde principalmente al genotipo observado y las condiciones del entorno en que se desarrolla (Taiz & Zeiger, 2002). El concepto “equilibrio funcional” de la distribución de la biomasa se refiere a la asignación de los nutrimentos y asimilados a los órganos, dando prioridad a los que se encuentren en condiciones desfavorables. Por ejemplo, las plantas asignarían más biomasa al sistema radical si el factor limitante se encuentra en contacto con las raíces (ej. sequía) mientras que en teoría se asignaría más biomasa a los tallos y hojas si el factor limitante se encuentra en la zona aérea de la planta (ej. poca luz) (Poorter et al., 2012). Por lo tanto, puede ser un parámetro que indique la respuesta de crecimiento en las plantas frente a una situación de estrés, en este caso de origen biótico. La RPA/R obtenida con el control comercial (C) mostró valor más alto con diferencia significativa comparado con los tratamientos de *T. harzianum* solo (A) y el consorcio microbiano (B). Esto indica que las plantas tratadas con *Trichoderma*

spp. lograron un mejor equilibrio entre el sistema radical y la parte aérea de la planta, fortaleciendo las raíces y mostrando cierto grado de adaptación a la infección de FOL.

4.5.4 Nutrientes en tejido foliar

Las medias de las concentraciones de nutrientes en hojas maduras de tomate infectado con FOL se encuentran en el Cuadro 3. En nutrientes como zinc, hierro y manganeso se encontraron sobrepasando los rangos de suficiencia, pero sin diferencias significativas entre tratamientos. Las plantas tratadas con el consorcio de *Trichoderma* spp. (B) concentraron en sus hojas una mayor cantidad de cobre respecto a la de los demás tratamientos.

Nitrógeno

La media más alta en la determinación de nitrógeno total corresponde al control comercial (Bioestimulante Actigard®). Es el único tratamiento que se diferenció significativamente en este nutriente. El tratamiento control comercial también fue el único que alcanzó una concentración de nitrógeno dentro del rango de suficiencia reportado para esta etapa. Fiorentino et al. (2018) estudiaron el contenido de nitratos en de lechuga, encontraron que la aplicación de *T. virens* y *T. harzianum* no promueven una mayor absorción de nitratos. También encontraron que la alta disponibilidad de N en el sustrato de cultivo limita la absorción de N y reduce los efectos benéficos de *Trichoderma* spp.

Se han documentado diversos manejos agronómicos en maíz y otras gramíneas que incluyen la aplicación de *Trichoderma* spp. y que tiene como efecto la disminución de la demanda de nitrógeno para producir la misma cantidad de biomasa, es decir, son más eficientes en el uso de este nutriente (Stewart & Hill, 2014).

Cuadro 3. Contenido de nutrimentos en hojas maduras de *Solanum lycopersicum* infectadas con FOL, tratadas con y sin *Trichoderma* spp.

Trat.	N	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Zn	Cu	Mn
	%						ppm			
A*	2.24b**	0.17b	4.55a	0.99a	1.35a	0.22a	198.15a	46.24a	9.32b	333.73a
B	2.36b	0.19b	4.45a	0.83b	1.55a	0.21a	81.82a	53.97a	14.72a	350.30a
C	2.89a	0.35a	3.94b	0.79b	1.41a	0.18a	134.86a	48.99a	10.98ab	315.15a
D	2.37b	0.22b	4.37ab	0.78b	1.35a	0.20a	210.07a	50.25a	8.18b	258.49a
RS	2.9-5.0	0.3-0.6	2.7-5.0	1.0-3.7	0.3-0.8	-	40-167	23-60	5.0-16.7	33.3-233
CV (%)	8.06	21.64	4.79	8.66	9.15	11.78	44.18	8.4	21.08	28.76

*A= *T. harzianum* (1x10⁶ conidios/mL), B= *T. harzianum* (1x10² conidios/mL) + *T. viride* (1x10² conidios/mL) + *T. atroviride* (1x10² conidios/mL), C=Control comercial (Actigard®), D=Control sin aplicaciones de bioestimulantes ni microorganismos, RS= Rango de suficiencia (Bryson & Mills, 2014; Santos & Torres-Quezada, 2018; Jones, 2008), CV= coeficiente de variación.

** Los valores con diferente letra dentro de la misma columna, representan diferencias significativas entre las medias analizadas con nivel de significancia de 5% según la prueba de comparación de medias de Tukey.

Fósforo

La concentración media más alta de fósforo también se presentó en el control comercial (Bioestimulante Actigard®). Las plantas que tenían tratamientos con *Trichoderma* spp. obtuvieron concentraciones por debajo del rango de suficiencia. En la investigación de Li et al. (2017) se reportaron que un tratamiento con aplicaciones de *T. asperellum* para controlar FOL, aumento la concentración de este nutriente, sin embargo, la solución nutritiva contenía niveles normales de fosforo.

La solubilización de fosfato es una acción comprobada de varios hongos del género *Trichoderma* (Stewart & Hill, 2014). Se ha logrado determinar mediante pruebas *in vitro* la solubilización de fosfatos en medios de cultivos por diversas especies de este hongo como *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum* y *T. virens* (Oliveira et al., 2012). Prasad et al. (2023) aislaron 19 cepas de *Trichoderma* y demostraron que todas poseían cierta capacidad para solubilizar fosfatos del medio. Sin embargo, las formas de fósforo que solubilizaron (fosfato tricálcico) probablemente no estuvieron presentes en el sustrato usado para las plantas de tomate cultivadas en este estudio.

Potasio

Los tratamientos del consorcio de *Trichoderma* spp. y *T. harzianum* fueron los que concentraron más potasio en sus hojas. Diferenciándose significativamente solo con el control comercial. No obstante, todas las medias de concentración de este nutriente están por encima de los rangos de suficiencia (Cuadro 3).

Li et al. (2017) y Fiorentino et al. (2018) reportaron aumentos significativos en el potasio contenido en las plantas (tomate y lechuga) tratadas con alguna especie de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. virens* y *T. asperellum*) en comparación con los controles sin inoculación con bioestimulantes.

Calcio y magnesio

Todos los tratamientos causaron una concentración de calcio por debajo del rango de suficiencia, el tratamiento que sí se diferenció significativamente en cuanto a la concentración de calcio en hojas de tomate fue el de *T. harzianum* (A).

Para magnesio no existieron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, todos los tratamientos resultaron muy por encima de los rangos de suficiencia.

4.5.5 Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)

Con los datos del progreso de la enfermedad en porcentaje se obtuvieron las gráficas de la Figura 2. En estas se aprecian las diferencias en la incidencia y permanencia de la enfermedad en las plantas infectadas con FOL y tratadas con *Trichoderma* spp., comparadas con los tratamientos control.

Desde el inicio de la evaluación se encontró que la incidencia de la enfermedad difiere entre los tratamientos con *Trichoderma* spp. (A=29 % y B=36 %) y los tratamientos control

(C=62 % y D=57 %). Las plantas de todos los tratamientos presentaron una tendencia a mejorar en las evaluaciones siguientes. Esta se nota principalmente en el tratamiento del consorcio de *Trichoderma* spp. (B) que pasó de 36 a 16 % en su última evaluación de los síntomas de la enfermedad. El tratamiento A, también disminuyó hasta 16 % la severidad de los síntomas en planta y desde la primera evaluación solo mostró una severidad de síntomas del 29%. Los tratamientos de control sin aplicaciones y control bioestimulante comercial bajaron en menor proporción la presencia de los síntomas (C=59 y D=49 %).

Rashid (2025) reportó que aplicaciones de *T. harzianum* reducen la severidad de los síntomas de *F. solani* un 72.7 % y de *F. acuminatum* 92.4 % en plantas de tomate.

Si bien ambas tecnologías de aplicación de *Trichoderma* spp. terminan con el mismo grado de infección de plantas (16 % después de 21 d de la infección), la infección se comportó diferente en las primeras evaluaciones (7 y 14 d después de la infección) muestran un menor ataque con el tratamiento de *T. harzianum* (A), que con el consorcio de tres cepas de *Trichoderma* (B).

Con los datos de ABCPE (Figura 9) se observa que los síntomas de la infección de FOL presentaron una reducción del 53 % para las plantas tratadas con el consorcio de *Trichoderma* spp. (B) con respecto al control sin aplicaciones. La aplicación de la cepa sola de *T. harzianum* (A) obtuvo un 47 % de reducción de los síntomas de la enfermedad con respecto al control sin aplicaciones. Las aplicaciones de *Trichoderma* spp. redujeron a la mitad el progreso de la infección de FOL en las plantas durante 21 días.

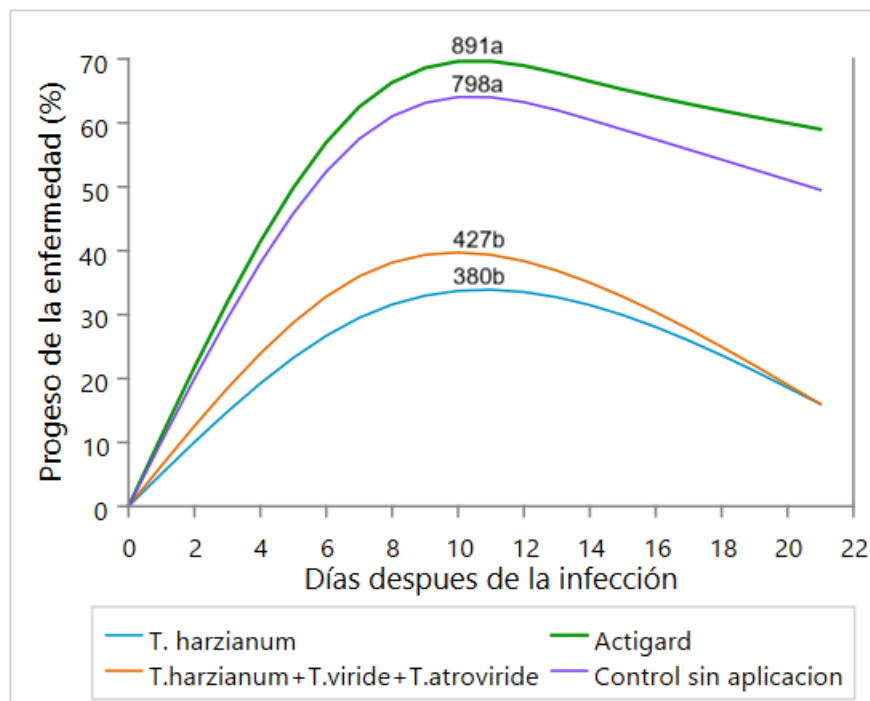


Figura 9. Progreso de la enfermedad causada por FOL en *Solanum lycopersicum* durante 21 días. Los valores sobre las líneas corresponden al ABCPE y los valores con diferentes letras corresponden a diferencias con nivel de significancia de 5 % según la comparación de medias de Tukey.

Hasna et al. (2025) observaron reducciones del ABCPE en tomate infectado por *Fusarium* sp., el tratamiento con aplicación de *T. asperellum* con ABCPE=242.84 y plantas inoculadas solo con *Fusarium* sp. con síntomas de la infección más severos (ABCPE = 351.34). Los tratamientos analizados en el presente estudio redujeron en una proporción mayor los síntomas de FOL en tomate.

En cuanto al control bioestimulante comercial Actigard® (C), este no disminuyó la incidencia de la enfermedad, al contrario, los síntomas se incrementaron con respecto al control sin aplicaciones (D). El ingrediente activo acibenzolar S metil, reduce los síntomas de la enfermedad mediante la inducción de la resistencia de la planta hacia el patógeno. La ficha técnica también indica que la autoprotección conferida a las plantas comienza al menos 4 d después de aplicado y las aplicaciones se deben realizar de manera foliar al menos 7 d después del trasplante.

En un experimento similar realizado por Li et al. (2017) una cepa de *T. asperellum* tuvo la capacidad de eliminar por completo los síntomas de FOL en plantas de tomate, además por sus tratamientos pre o post infección puede señalar que el momento clave para la aplicación de *Trichoderma* spp. es justo después de la infección con FOL, ya que los síntomas de la enfermedad no se presentaron.

4.6 Conclusiones

Las aplicaciones de *Trichoderma* spp. mostraron efectos positivos sobre el crecimiento y la tolerancia de plantas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Tanto la aplicación individual de *T. harzianum* como el consorcio microbiano disminuyeron significativamente el progreso de la enfermedad y favorecieron la acumulación de biomasa, principalmente en el sistema radical. El consorcio de especies presentó la mayor reducción del ABCPE, mientras que *T. harzianum* mostró una respuesta más eficiente durante las primeras etapas de infección. Los resultados obtenidos sugieren que las tecnologías de aplicación basadas en *Trichoderma* spp. constituyen una alternativa viable para el manejo sustentable de la marchitez vascular en tomate y representan una estrategia con potencial para reducir la dependencia de fungicidas sintéticos en sistemas hortícolas protegidos.

4.7 Literatura Citada

Alfiky, A. & Weisskopf, L. (2021). Deciphering *Trichoderma*–plant–pathogen interactions for better development of biocontrol applications. *Journal of Fungi*, 7(1), Article 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>

Barroso, G., Custódio, I., Borges, C., dos Santos, E., Andrade T., Soares, M., Duque, T., de Abreu, C., & dos Santos, J. (2025). Pesticide residues in Brazil: Analysis of environmental legislation and regulation and the challenge of sustainable production. *Sustainability*, 17, Article 2583. <https://doi.org/10.3390/su17062583>

Battaglia, M., Martinez, S., Covacevich, F., & Consolo, V. (2024). *Trichoderma harzianum* enhances root biomass production and promotes lateral root growth of soybean and common bean under drought stress. *Annals of Applied Biology*, 185(1), 36-48. <https://doi.org/10.1111/aab.12909>

Bryson, G. & Mills, H. (2014). *Plant Analysis Handbook IV*. Micro-Macro Publishing, Inc.

Cavicchioli, R., Ripple, W., Timmis, K., Azam, F., Bakken, L., Baylis, M., Behrenfeld, M., Boetius, A., Boyd, P., Classen, A., Crowther, T., Danovaro, R., Foreman, C., Huisman, J., Hutchins, D., Jansson, J., Karl, D., Koskella, B., Welch, M., Martiny, J., Moran, M., Orphan, V., Reay, D., Remais, J., Rich, V., Singh, B., Stein, L., Stewart, F., Sullivan, M., van Oppen, M., Weaver, S., Webb, E., & Webster, N. (2019) Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, 17(9), 569-586. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>

Druzhinina, I., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B., Kenerley, C., Monte, E., Mukherjee, P., Zilenger, S., Grigoriev, I., & Kubicek, C. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature reviews microbiology*, 9(10), 749-759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>

Fiorentino, N., Ventrino, V., Woo, S., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G., & Rouphael, Y. (2018). *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. *Frontiers in Plant Science*, 9, Article 743. doi: 10.3389/fpls.2018.00743

Gutiérrez-Moreno, K., Olguín-Martínez, A., Montoya-Martínez, A., & de los Santos-Villalobos, S. (2025). *Trichoderma* in sustainable agriculture and the challenges related to its effectiveness. *Diversity*, 17(10), Article 734. <https://doi.org/10.3390/d17100734>

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

Hasna, M., Paul, N., Haque, M., Bir, M., Ali, M., & Chong, K. (2025). Biocontrol efficacy of *Trichoderma asperellum* against *Fusarium* wilt in tomato plants by induction of the host defense genes. *Discover Plants*, 2(1), Article 136. <https://doi.org/10.1007/s44372-025-00224-1>

Hough, R. (2021). A world view of pesticides. *Nature Geoscience*, 14(4), 183-184. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00718-z>

Jones, J. B. (2008). Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden (2nd ed.) CRC Press.

Kubiak, A., Wolna-Maruwka, A., Pilarska, A., Niewiadomska, A., & Piotrowska-Cyplik, A. (2023). Fungi of the *Trichoderma* genus: future perspectives of benefits in sustainable agriculture. *Applied Sciences*, 13(11), Article 6434. <https://doi.org/10.3390/app13116434>

Li, Y., Hwang, S., Huang, Y., & Huang, C. (2017). Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato. *Crop Protection*, 110, 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.021>

Oliveira, A., Chagas A., Santos, G., Miller, L. & Chagas, L. (2012) Potential phosphate solubilization and AIA production of *Trichoderma* spp, *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 7(3), 149–155.

Poorter, H., Niklas, K., Reich, P., Oleksyn, J., Poot, P., & Mommer, L. (2012). Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New phytologist*, 193(1), 30-50. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03952.x

Prasad, A., Dixit, M., Meena, S., & Kumar, A. (2023). Qualitative and quantitative estimation for phosphate solubilizing ability of *Trichoderma* isolates: A natural soil health enhancer. *Materials Today: Proceedings*, 81, 360-366. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.305>

Manjunath, G. (2022) Biorationals and biopesticides for disease management of horticultural crops. In R. Rajeshwari & V. Appanna (Eds.), *Biopesticides in horticultural crops* (pp. 12-19). CRC Press. doi: 10.1201/9781003243427[

Rashid, T. (2025) Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a natural biocontrol and growth-promoting agent against selected tomato fungal pathogens. *Journal of Phytopathology*, 173(4), Article e70130. <https://doi.org/10.1111/jph.70130>.

Salwan, R., Rialch, N., & Sharma, V. (2019). Bioactive volatile metabolites of *Trichoderma*: An overview. In H. Singh, C. Keswani, M. Reddy, E. Sansinenea, C. García-Estrada, (Eds.) *Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: Discovery and applications* (pp. 87-111). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_5

Santos, C., & Torres-Quezada, F. (2018). Irrigation and fertilization. In E. Heuvelink (Ed.), *Tomatoes* (2nd ed., pp. 1-26). CABI.

Stewart, A., & Hill, R. (2014). Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In V. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, M. Upadhyay, I. Druzhinina & M. Tuohy. *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 415-428). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00031-X>

Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. (3rd ed.)

Tang, F., Lenzen, M., McBratney, A., & Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature geoscience*, 14(4), 206-210. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00712-5>