

**IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp.
BIOCONTROLADORAS DE *Sclerotium* sp. Y PROMOTORAS DE
CRECIMIENTO EN PLANTULAS DE BERENJENA (*Solanum melongena* L.) EN
CÓRDOBA**

**KEYLA DE JESÚS MARTÍNEZ DE LA OSSA
MARISELA VARGAS ÁVILA**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
MONTERÍA
2021**

**IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Trichoderma* spp.
BIOCONTROLADORAS DE *Sclerotium* sp. Y PROMOTORAS DE
CRECIMIENTO EN PLANTULAS DE BERENJENA (*Solanum melongena* L.) EN
CÓRDOBA**

**KEYLA DE JESÚS MARTÍNEZ DE LA OSSA
MARISELA VARGAS ÁVILA**

**Trabajo de grado en la modalidad investigación como requisito para optar al
título de Ingeniero Agrónomo.**

**Director:
JUAN DE DIOS JARABA NAVAS, Ph.D., Fitopatología
LUIS ALFONSO RODRIGUEZ PAEZ, M.Sc., Biotecnología**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
MONTERÍA
2021**

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas expresadas, conceptos y resultados del proyecto son responsabilidad de los autores.

Artículo 17, acuerdo No. 039 del 24 de junio de 2005 del Consejo Superior de la Universidad de Córdoba.

Los derechos de propiedad intelectual y confidencialidad de los resultados de investigación se rigen por la política de propiedad intelectual de la Universidad de Córdoba: Acuerdo No. 045 de 2018.

Nota de Aceptación

Nombre Primer Jurado, Ph.D., Jurado.

Nombre Segundo Jurado, Ph.D., Jurado.

Juan de Dios Jaraba Navas, Ph.D., Director.

Luis Alfonso Rodríguez Páez, M.Sc., Co-Director

Montería, abril 19 de 2021

DEDICATORIA

Primeramente, quiero dedicarle este trabajo a Dios, por haberme permitido llegar a este momento tan importante que es mi formación como profesional.

A mi madre Silvia, por ser el pilar más importante en mi vida, por su confianza, apoyo, por ser esa madre ejemplar que me ha enseñado a no rendirme ante las adversidades y perseverar brindándome sus sabios consejos.

A mi padre Alejandro, por estar presente en mi vida, brindándome su afecto, amor y protección.

A mis hermanos Ana y Alejandro que siempre han estado junto a mí, apoyándome y aconsejándome lo que me ha permitido afrontar retos a lo largo de mi vida.

Al profesor Juan de Dios Jaraba Navas, quien fue mi mentor, mi guía, mi consejero durante la formulación y ejecución de mi proyecto de grado, por brindarme su apoyo y estar presente en los altibajos, infinitas gracias.

Al profesor Luis Alfonso Rodríguez Páez por su dedicación y apoyo incondicional para guiarme durante el proceso, por sus conocimientos y ayuda, mil gracias.

A mi amiga Keyla Martínez de La Ossa, porque hoy puedo decir lo logramos y que pese a las adversidades estuvimos la una para la otra, con un objetivo y mucha perseverancia, gracias por ser parte de esta etapa tan importante en mi vida.

Gracias Rubén, Leider y a todas esas personitas, por su gran apoyo, ustedes cumplieron un papel fundamental para culminar este proceso.

Marisela Vargas Ávila

DEDICATORIA

Hoy finaliza una de las etapas más importante para mí, y quiero agradecer primero a Dios creador de todas las cosas y mi principal pilar, inspiración y, guía,

A mis padres Teresa de Jesús De la Ossa López y Juan José Martínez López, los cuales fueron una constante inspiración a seguir adelante y no darme por vencida, aunque el camino se fuera tornado complicado y las situaciones pareciera no tener solución.

A mis hermanos Isaac Arrieta De La Ossa y Tatiana Martínez De La Ossa, los cuales me brindaron su compañía y concejo en todo este proceso.

A mi profesor Juan de Dios Jaraba Navas quien fue mi mentor, guía y una gran ayuda no solo en este proceso investigativo, sino además como amigo, compañero en momentos de éxitos, errores y un gran ejemplo a seguir.

A mi profesor Luis Alfonso Rodríguez, quien fue la primera persona en alentarme e impulsarme en la investigación, además de ser un apoyo, guía y amigo en todo mi proceso académico.

A mi compañera y sobre todo mi amiga Marisela Vargas Ávila, la persona que me acompañó desde el primer momento de mi carrera e investigación con quien puede compartir cada vitoria y vivir cada derrota, pero sobre todo con quien aprendí a levantarme en cada una de ellas.

A cada uno de mis amigos quienes cumplieron un papel fundamental en esta investigación, ya que de ellos recibí apoyo ayuda y acompañamiento.

Keyla Martínez de la Ossa

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por cada una de sus bendiciones, por darnos la fortaleza, sabiduría e inteligencia, para superar cada uno de los obstáculos presentes en el camino.

Gracias a nuestro director Dr. Juan de Dios Jaraba Navas por su generosidad al brindarnos sus conocimientos y experiencia científica, apoyo, enorme paciencia, orientación y guiarnos a culminar este trabajo de manera satisfactoria, porque más que un director de tesis nos brindó su amistad y consejos para ser mejor cada día.

A nuestro codirector M. Sc., Luis Alfonso Rodríguez Páez por siempre estar presto a enriquecer nuestro proceso académico con sus conocimientos, tiempo y recursos, por brindándonos su disposición y apoyo incondicional, los que fueron fundamentales para culminar esta investigación y nuestro proceso académico.

A nuestros jurados Rodrigo Campo y Luis Oviedo Zumaqué por estar prestos a brindarnos su orientación durante la presente investigación.

A la Ing. Y auxiliar de laboratorio Naudith Urango y a la señora Ana Doria del laboratorio de Fitopatología de la universidad de Córdoba, a la Bióloga Yirlis Pineda y el Biólogo Mauricio Begambre por compartir su tiempo, conocimiento y muchas de las herramientas que fueran de gran utilidad para culminar este proceso investigativo.

A nuestras familias por brindarnos su confianza, fuerza, apoyo y motivación, en nuestro proceso formativo.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN GENERAL	14
ABSTRACT GENERAL	15
CAPÍTULO I	16
INTRODUCCIÓN GENERAL	16
1.1 INTRODUCCIÓN	17
1.2 DEFINICIÓN DE PROBLEMA.....	19
1.3 GENERALIDADES DE LA TEMÁTICA	21
1.3.1 El cultivo de Berenjena en la región Caribe Colombiana.	21
1.3.2 Uso de bioinsumos en la agricultura moderna.	21
1.3.3 El género <i>Trichoderma</i> y sus características.	22
1.3.4 Ventajas del uso de <i>Trichoderma</i> en la agricultura.	23
1.3.5 Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> spp. sobre las plantas.	24
1.3.6 Estudios sobre cepas de <i>Trichoderma</i> en el cultivo de Berenjena.	26
1.3.7 Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> como agente causal de la marchitez de la Berenjena.	27
1.3.8 Estudios de caracterización molecular de cepas de <i>Trichoderma</i>	28
1.4 OBJETIVOS	31
1.4.1 Objetivo general	31
1.4.2 Objetivos específicos	31
1.5 LITERATURA CITADA.....	32
CAPÍTULO II	40
AISLAMIENTO DE CEPAS DE <i>Trichoderma</i> spp. DE SUELOS CULTIVADOS CON BERENJENA EN CÓRDOBA	40

RESUMEN.....	41
ABSTRACT	42
2.1 INTRODUCCIÓN	43
2.2 METODOLOGÍA	44
2.2.1 Localización y época de evaluación.....	44
2.2.2. Toma de muestras en campo.	44
2.2.3. Análisis de suelos y georreferenciación.....	44
2.2.4. Procesamiento de muestras.	44
2.2.5. Obtención de aislamientos y purificación de los hongos.	44
2.2.6. Identificación de los aislamientos.....	45
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
2.3.1 Aislamiento de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp.	46
2.4 CONCLUSIONES	48
2.5 LITERATURA CITADA.....	49
CAPÍTULO III	51
CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE <i>Trichoderma</i> spp.	51
RESUMEN.....	52
ABSTRACT	53
3.1 INTRODUCCIÓN	54
3.2 METODOLOGÍA	55
3.2.1 Localización y época de evaluación.....	55
3.2.2 Recolección de muestras en campo.	55
3.2.3 Procesamiento en laboratorio	55
3.2.4 Caracterización morfométrica de las cepas	55
3.2.5 Caracterización e identificación molecular de aislamientos.	55

3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
3.3.1	Caracterización morfológica de cepas nativas.....	58
3.3.2	Caracterización molecular de cepas.	62
3.4.	CONCLUSIONES	70
3.5.	LITERATURA CITADA.....	71
	CAPÍTULO IV.....	73
	EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO <i>In-vitro</i> DE <i>Trichoderma</i> spp. CONTRA <i>Sclerotium</i> sp.	73
	RESUMEN	74
	ABSTRACT	75
4.1.	INTRODUCCIÓN	76
4.2.	MATERIALES Y METODOS.....	79
4.2.1.	Localización.	79
4.2.2.	Material biológico.....	79
4.2.3.	Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i> (cultivos duales).	79
4.2.4.	Evaluación de <i>Trichoderma</i> spp. sobre la germinación de semillas.....	80
4.2.5.	Evaluación del efecto de las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de plántula de Berenjena.	81
4.2.6.	Diseño experimental:	81
4.2.7.	Análisis estadístico.	82
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
4.3.1.	Capacidad antagonica in vitro de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Sclerotium</i> sp.	83
4.3.2.	Efecto de las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre la germinación de semillas de Berenjena en laboratorio.....	86

4.3.3. Efecto de las cepas de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de plántulas de Berenjena.	87
4.4. CONCLUSIONES	92
4.5. LITERATURA CITADA.....	93
CAPÍTULO V.....	100
5. DISCUSIÓN GENERAL	101
5.1. LITERATURA CITADA	103
6. CONCLUSIÓN GENERAL	107

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO 2

Pág

Tabla 2.1. Aislamientos y procedencias de cepas de <i>Trichoderma</i> spp. aisladas de cultivos de Berenjena en Córdoba, Colombia.	47
--	----

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1. Programa de PCR para amplificación de ADN fúngico con los primers universales Its4 e Its3.	56
Tabla 3.2. Caracterización morfológica de diez aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. provenientes de suelos cultivados con berenjena en el departamento de Córdoba, Colombia.	59
Tabla 3.3. Secuenciación de las regiones ITS3, ITS4 y del gen 5.8S del ADNr de 8 aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. y la búsqueda BLAST.	65
Tabla 3.4. Caracterización de cepas de <i>Trichoderma</i> usadas como controles para la construcción del árbol filogenético de ocho asilamientos.	68

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1. Capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> según la escala de Bell et al. (1982).	80
Tabla 4.2. Cuadrados medios, coeficientes de variación y nivel de significancia del análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR).	83
Tabla 4.3. Valores medios y diferencias estadísticas para el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Sclerotium</i> sp.	85
Tabla 4.4. Resultados del análisis de varianza para el porcentaje de germinación G72 (germinación a las 72 horas) de semillas de <i>Solanum melongena</i> tratadas con <i>Trichoderma</i> spp. (1×10^8 conidias/gr de suelo).	86
Tabla 4.5. Valores medios y diferencias estadísticas para el porcentaje de germinación de semillas <i>Solanum melongena</i> tratadas con <i>Trichoderma</i> spp. (1×10^8 conidias/gr de suelo).	87

Tabla 4.6. Cuadrados medios y nivel de significancia para la masa seca de tallo (MST), masa seca de raíz (MSR), masa seca total (MT), altura de planta (ALT), número de hojas (NH), número de nudos (NN) y longitud de raíz (LRAÍZ) de berenjena..... 88

Tabla 4.7. Valores medios para la masa seca de tallo (MST), masa seca de raíz (MSR), masa seca total (MT), altura de planta (ALT), número de hojas (NH), número de nudos (NN) y longitud de raíz (LRAÍZ) de berenjena..... 90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3

- Figura 3.1.** Apreciación morfológica de 10 aislamientos de *Trichoderma* spp. en medio PDA provenientes de suelos cultivados con Berenjena. A) Th002; B) Th003; C) Th004; D) Th005; E) Th0010; F) Th008; G) Th001; H) Th007; I) Th006 y J) Th009. 60
- Figura 3.2.** Continuación: Apreciación morfológica de 10 aislamientos de *Trichoderma* spp. en medio PDA provenientes de suelos cultivados con Berenjena. A) Th002; B) Th003; C) Th004; D) Th005; E) Th0010; F) Th008; G) Th001; H) Th007; I) Th006 y J) Th009..... 61
- Figura 3.3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR Green de los amplicones del gen ITS de diez aislamientos de *Trichoderma* spp..... 64
- Figura 3.4.** Dendograma de aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos de sistemas productivos de berenjena en el departamento de Córdoba, Colombia. ... 69

RESUMEN GENERAL

El cultivo de berenjena (*Solanum melongena* L.) constituye la hortaliza de mayor importancia en el departamento de Córdoba. Sin embargo, dentro de los retos productivos de este cultivo está el manejo de la marchitez y muerte de las plantas causadas por la presencia del hongo *Sclerotium* spp., el cual causa marchitez y muerte de plantas. Adicionalmente, la nutrición del cultivo está soportada en el uso de fertilizantes de síntesis química, que causan contaminación ambiental. El objetivo de este estudio fue contribuir con el manejo fitosanitario de *Sclerotium* sp. y la nutrición en plántulas de berenjena mediante el uso de cepas *Trichoderma* spp., aisladas de lotes comerciales del cultivo en la zona productora del departamento. Se tomaron muestras de suelo en lotes comerciales en los municipios de Montería, Cereté, San Pelayo y Tierralta. Cada muestra estuvo constituida de cinco submuestras de suelo rizosférico. Las muestras fueron procesadas usando la técnica de dilución seriada (10^3 conidias. mL⁻¹). Los aislamientos de *Trichoderma* spp. fueron purificados en PDA y caracterizados morfológica, morfométrica y molecularmente. La capacidad biocontroladora *in vitro* de cada cepa de *Trichoderma* spp., sobre *Sclerotium* spp., se determinó mediante la técnica de cultivos duales en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), midiendo el porcentaje de crecimiento radial. La capacidad promotora de germinación en semillas y crecimiento de plántulas fue evaluada en cada cepa de *Trichoderma* spp. en condiciones de laboratorio y casa malla, respectivamente. Diez cepas fueron aisladas de las zonas muestreadas. De seis cepas aisladas en el municipio de Cereté, dos correspondieron a *Trichoderma asperellum*, una a *T. virens* y tres a *Trichoderma* sp. En San Pelayo se aislaron dos cepas y se clasificaron efectivamente como aislados de *Trichoderma* sp. Dos cepas más se identificaron en Tierralta, correspondientes a *Trichoderma lixii* y *T. asperellum*. En la evaluación de cultivos duales, las especies *Trichoderma lixii* (T001) y *Trichoderma asperellum* (T007 y T008) presentaron mayor capacidad biocontroladora contra el hongo *Sclerotium*. Adicionalmente, *T. lixii* (T001) generó el mayor porcentaje de semillas germinadas con 88,75%; seguido por *Trichoderma* sp. (T002) con 80,50%, el cual además generó el mayor PICR después de 72 horas de evaluación. De igual manera, los aislamientos provenientes de Cereté; *T. virens* (T005) y *T. asperellum* isolate TV190 (T008) y el aislado de San Pelayo, *Trichoderma* sp. Isolate SDAS203498, mostraron mayor capacidad para promover el crecimiento de plántulas en las variables masa seca de tallo (MST), masa seca de raíz (MSR), masa seca total (MT), altura de planta (AP) y longitud de raíz (LRAÍZ). El número de hojas y nudos (NH y NN respectivamente) no fue afectado por el efecto promotor de *Trichoderma*. Estos resultados nos permiten inferir que el o los aislamientos *T. lixii* (T001), *Trichoderma* sp. (T006) y *T. asperellum* (T008) son promisorios para el manejo de *Sclerotium* y la inducción y desarrollo del crecimiento de plántulas de berenjena.

Palabras clave: *Trichoderma*, *Sclerotium*, Berenjena, Córdoba.

ABSTRACT GENERAL

The cultivation of eggplant constitutes the most important vegetable in the department of Córdoba. However, the greatest productive challenges of this crop is the presence of the *Sclerotium* spp. Fungus, which causes wilting and death. In addition, the nutrition of the crop is supported by the use of chemical synthesis fertilizers, which cause environmental pollution. The objective of this study was to contribute to the phytosanitary management of *Sclerotium* spp. and nutrition in eggplant seedlings through the use of *Trichoderma* spp. strains, isolated from commercial batches of the crop in the department's producer. Soil samples were taken in commercial lots in the municipalities of Montería, Cereté, San Pelayo and Tierralta. Each sample consisted of five rhizospheric soil subsamples. The samples were processed using the serial dilution technique (10^3 conidia. mL⁻¹). The isolates of *Trichoderma* spp. they were purified in PDA and characterized morphologically, morphometrically and molecularly. The in vitro biocontroller capacity of each *Trichoderma* spp. strain, on *Sclerotium* spp., is determined by the dual culture technique in Potato Dextrose Agar (PDA) medium, measuring the percentage of radial growth. The promoter capacity of seed germination and growth of eggplant seedlings was implemented in each strain of *Trichoderma* spp. in mesh house conditions. Ten strains were isolated in Cereté (6), San Pelayo (2) and Tierralta (2). In the dual cultures test, the species *Trichoderma lixii* (T001) and *Trichoderma asperellum* (T007 and T008) showed high biocontrolling capacity against the *Sclerotium* fungus. Additionally, *T. lixii* (T001) generated the highest percentage of germinated seeds with 88.75%; followed by *Trichoderma* sp. (T002) with 80.50%, which also generated the highest PICR after 72 hours of evaluation. Similarly, the isolates from Cereté; *T. virens* (T005) and *T. asperellum* isolate TV190 (T008) and the San Pelayo isolate, *Trichoderma* sp. Isolate SDAS203498, showed greater capacity to promote seedling growth in the variables stem dry mass (MST), root dry mass (MSR), total dry mass (MT), plant height (AP) and root length (LRAÍZ). The number of leaves and nodes (NH and NN respectively) was not affected by the promoter effect of *Trichoderma*. These results allow us to infer that the *Trichoderma lixii* (T001), *Trichoderma* sp. (T003) and *Trichoderma asperellum* (T008) may be used as an alternative to the use of chemical products for the control of *Sclerotium* and the use of chemical fertilizers in the cultivation of eggplant in Córdoba.

Key words: *Trichoderma*, *Sclerotium*, Eggplant, Córdoba.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

GENERAL INTRODUCTION

1.1 INTRODUCCIÓN

La expansión de la frontera agrícola ha sido una de las actividades antropogénicas de mayor impacto sobre los ecosistemas, debido a la diversificación de los cultivos, los procesos de irrigación y el uso indiscriminado de pesticidas y fertilizantes. La intensificación sostenible de la producción agrícola, por lo tanto, exige un enfoque integrado que ayude a conservar los ecosistemas (Vera-Núñez et al. 2019; Reyes y Cortés, 2017). El uso de bioplaguicidas, bioestimuladores y biofertilizantes, ofrecen una gran alternativa en el manejo a largo plazo de las plagas y enfermedades, así como en el manejo de la fertilización del cultivo, los cuales se pueden integrar con la mayoría de las otras medidas de protección de plantas utilizadas en el programa integrado de manejo de enfermedades (Ram et al. 2018).

Dentro de estas alternativas, se encuentra el uso de bioinsumos (biofertilizantes, bioestimuladores y bioplaguicidas), como complemento al manejo convencional de cultivos (Mamami de Marchese y Filipone, 2018). Zambrano-Moreno et al. (2015), indican que, dentro de los microorganismos más empleados, se encuentran cinco grupos morfológicos: hongos filamentosos, hongos micorrízicos, bacilos y levaduras. Predominan los hongos filamentosos, con un 59,6%, seguido por los hongos micorrízicos, con un 18,6%.

Trichoderma spp., es un hongo de gran valía para ser utilizado con eficacia en la agricultura sostenible, a través de la interacción planta-suelo. *Trichoderma* spp. se encuentra entre los hongos antagonistas más utilizados en agricultura por su alta capacidad de producción de enzimas hidrolíticas y mecanismos de micoparasitismo y antibiosis que puede inhibir o controlar hongos y nematodos fitopatógenos y su desarrollo es favorecido por la presencia de alta densidad de raíces (Hoyos-Carvajal, 2012; Błaszczuk et al. 2014).

Las especies de *Trichoderma* son hongos oportunistas que residen principalmente en el suelo, la corteza de los árboles y los hongos silvestres. *Trichoderma* spp. se usa comúnmente como biofungicida, biofertilizante, enmienda del suelo e inductor de la defensa de la planta contra los patógenos. Estos hongos también ejercen otros efectos beneficiosos sobre las plantas, incluida la promoción del crecimiento y la tolerancia al estrés abiótico, principalmente mediado por sus interacciones íntimas con las raíces, inducen resistencia sistémica, aumentan la disponibilidad y absorción de nutrientes, mejoran el rendimiento de los cultivos y degradan los pesticidas xenobióticos, complementando su papel como componentes principales en formulaciones comerciales (Harman, 2006; Kredics et al. 2014; Mendoza-Mendoza et al. 2018).

Por todo lo anterior, se requería generar información básica sobre las especies de *Trichoderma* spp. presentes en suelos cultivados con berenjena en el departamento de Córdoba, cultivo que representa la hortaliza de mayor importancia en el territorio. Ello implicaba, determinar la presencia de cepas del hongo, caracterizarlas morfológica y molecularmente y evaluar su potencial antagónico frente al hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*, de gran importancia en este cultivo. Ello, permitirá el uso de especies o aislamientos de gran adaptabilidad regional y capacidad biocontroladora y/o bioestimuladora de germinación o crecimiento de plántulas, que serán la base de programas de manejo integrado más eficiente en condiciones de campo y que reduzcan el impacto de agroquímicos en el ecosistema cordobés.

1.2 DEFINICIÓN DE PROBLEMA

En el departamento de Córdoba, la berenjena (*Solanum melongena* L.) representa la solanácea de mayor importancia económica después del ají (*Capsicum* spp.) (Araméndiz et al., 2008b). Según Cantero et al. (2015), las zonas productoras de mayor importancia en el Caribe colombiano, se encuentran localizadas en Córdoba. Según Agronet (2019), el área cultivada en el mismo departamento para el año 2017 fue de 215 hectáreas en comparación con el año 2018 que fue de 192 hectáreas, lo cual es indicativo de una clara reducción en la producción de este rubro.

Adicionalmente, los rendimientos en el departamento son los más bajos del país con $3,3 \text{ t ha}^{-1}$ siendo superado por Valle del Cauca ($25,07 \text{ t.ha}^{-1}$), Magdalena ($9,5 \text{ t.ha}^{-1}$), Atlántico ($7,78 \text{ t.ha}^{-1}$) y Bolívar ($6,15 \text{ t.ha}^{-1}$). Las razones de la disminución acelerada de los rendimientos por unidad de superficie en este cultivo, se sustenta en la ausencia de programas de certificación de semillas y plántulas bajo sistemas de producción que presentan serias limitantes tecnológicas que reducen la competitividad de los agricultores; ya que los agricultores usan semillas derivadas de sus propios cultivos y producen plántulas con sustratos de desconocida calidad, además de la presencia agravante de problemas fitosanitarios ocasionan pérdidas hasta del 50% en las plantaciones; la fertilización inadecuada y el desconocimiento de alternativas sostenibles de manejo de la productividad del suelo (Araméndiz-Tatis et al. 2013; Cantero et al. 2015; Reyes y Cortes, 2017; Reyes-Pérez et al. 2018).

Otro inconveniente son los altos costos en el establecimiento y manejo de los semilleros y plántulas de berenjena, debido al empleo de grandes cantidades de insumos energéticos; en especial, los fertilizantes químicos. El uso de elevadas dosis de fertilizantes minerales, específicamente nitrogenados y fosfatados, causan daños graves al ambiente y que los abonos orgánicos en cantidades normales, no contienen los nutrimentos suficientes para la obtención de cosechas rentables. La producción de plántulas de Berenjena, además, ha estado basada fundamentalmente en el uso intensivo de fertilizantes químicos que se incrementa continuamente (lo cual dañan el suelo, contaminan las aguas, así como contribuyen significativamente al cambio climático del planeta). Además de la falta de cultura en la utilización de abonos orgánicos y poca oferta de los mismos en el mercado (Benbi, 2013; Reyes y Cortés, 2017).

En las zonas productoras del departamento de Córdoba se han observado problemas fitosanitarios, entre estos el que más afecta al cultivo de berenjena y que más deja pérdidas económicas es la marchitez foliar causada por el hongo *Sclerotium* sp. el cual tiene una amplia distribución e importancia en esta zona productora de berenjena. El patógeno causa Damping-off de plántulas en semillero y marchitez y muerte de la planta en etapas posteriores, lo cual puede afectar hasta

el 60% de las plantas cultivadas (Adams, 1990; Goldman et al., 1994). El manejo de la marchitez por *Sclerotium* sp., es realizado con fungicidas como benomyl, carbendazim, oxiclورو de cobre y algunos triazoles, los cuales son utilizados de manera rutinaria, en la mayoría de los casos sin ningún tipo de recomendación técnica, sin tener en cuenta las medidas de seguridad adecuadas para la aplicación de estos fungicidas, causando grandes pérdidas económicas agrícolas y afectando la salud del pequeño y mediano productor (Criollo et al. 2011).

Por lo anterior, se requiere investigar la existencia de microorganismos adaptados a suelos, en lotes comerciales de berenjena en departamento de Córdoba, capaces de favorecer la nutrición y controlar *Sclerotium* sp., en este cultivo, que puedan ser usadas en el manejo del cultivo. Ello permitirá establecer prácticas amigables con el medio ambiente que permita mejorar la calidad, sanidad e inocuidad de los frutos y disminuir el impacto negativo del uso intensivo de agroquímicos en el agroecosistema del cultivo de la Berenjena.

En torno a la problemática anteriormente planteada y en el marco de la presente investigación, tributan preguntas a solucionar como: ¿Existen en los suelos cultivados con Berenjena del departamento de Córdoba, cepas de *Trichoderma* que puedan ser biocontroladoras de *Sclerotium* sp y promotoras de crecimiento en plántulas de berenjena?

1.3 GENERALIDADES DE LA TEMÁTICA

1.3.1 El cultivo de Berenjena en la región Caribe Colombiana. La berenjena (*Solanum melongena* L.) es una hortaliza perteneciente a las angiospermas y se ubica dentro de la familia Solanaceae, la cual a su vez está compuesta por 83 géneros que engloban unas 1.000 -1.400 especies de amplia distribución por todo el mundo, especialmente en zonas templadas y tropicales (D'Arcy, 1991; Sambamurty, 2005; Hurtado, 2015). Es cultivada a gran escala en Asia, África y en áreas tropicales y subtropicales de la India y América, tiene un gran consumo en China, India e Irán (Araméndiz et al. 2008b). En Colombia, esta especie es cultivada en áreas que oscilan entre 1.000 y 5.000 m², manejadas con problemas tecnológicos y de comercialización (Araméndiz-Tatis et al. 2014). Uno de los factores que ocasionan estos problemas son la fertilización inadecuada y el desconocimiento de alternativas sostenibles de manejo de la productividad reflejados en bajos rendimientos, por debajo de 16 t.ha⁻¹, donde el 30% de los frutos no cumplen con la calidad, tamaño y forma requeridos por el mercado, lo que reduce su competitividad en el mercado nacional y sus posibilidades de apuesta agrícola de exportación (Brun y Flórez, 2009, citado por Cantero et al. 2015; Agronet, 2017; Araméndiz-Tatis et al. 2017).

El cultivo de berenjena tiene un gran arraigo en la culinaria de la costa caribe colombiana, exactamente en los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar, donde goza de aceptación en los diferentes estratos sociales. (Araméndiz et al. 2008b; Araméndiz-Tatis et al. 2014). Las zonas productoras de mayor importancia en el Caribe colombiano están localizadas en el departamento de Magdalena, que concentra el 53,99 % de la producción nacional, seguido por Bolívar con el 18,45 % y Valle del Cauca con el 13,20 % y finalmente Córdoba con una participación del 10,33 % (Agronet 2018b).

1.3.2 Uso de bioinsumos en la agricultura moderna. La intensificación agrícola a través del uso de agroquímicos ha incrementado enormemente la capacidad productiva de los agroecosistemas. Sin embargo, también ha provocado consecuencias no deseadas, como el aumento de la contaminación ambiental y la degradación de los recursos suelo y agua. Se ha demostrado que el uso indiscriminado de agroquímicos no solo afecta a la fertilidad del suelo y contamina el ambiente, sino que también podría ejercer efectos deletéreos sobre sus poblaciones microbianas (Youssef y Eissa, 2014; Creus, 2017).

El objetivo de la agricultura sustentable es mantener una alta producción con un descenso gradual del uso de agroquímicos, recurriendo al potencial biológico de las plantas y los microorganismos. En ese contexto, el uso de inoculantes compuestos por microorganismos benéficos, ya sean fitoestimulantes, biofertilizantes o agentes de biocontrol, constituye una estrategia tecnológica cada vez más aceptada en las

prácticas agrícolas sustentables, tanto para cultivos extensivos como intensivos (Creus, 2017).

En el Caribe colombiano, los impactos que causa la agricultura convencional son cada vez más fuertes (Tofiño et al. 2016). El manejo integrado de cultivos está limitado, entre otras razones, por la escasez de estudios de compatibilidad entre los bioinsumos y los agroquímicos que se usan comúnmente en hortalizas (Melo et al. 2015), así como por el desconocimiento de los productores de aspectos relevantes del uso de bioinsumos como estrategia de manejo (Mena-Rodríguez et al. 2018). Aunque en el Caribe seco colombiano son pocos los estudios sobre la inclusión de bioinsumos en hortalizas, actualmente se están explorando alternativas de control con productos a base de biocontroladores y extractos vegetales, que generalmente poseen compuestos biodegradables, de baja toxicidad y no son específicos en su modo de acción (Tofiño et al. 2012; Gaviria-Hernández et al. 2013).

1.3.3 El género *Trichoderma* y sus características. El género *Trichoderma*, (teleomorfo *Hypocrea-Ascomycetes: Hypocreales*) agrupa más de 100 especies en su mayoría asociadas a estados telomórficos en el género *Hypocrea* (Druzhinina et al. 2006). Las especies del género *Trichoderma* son cosmopolitas y componentes prevalentes de diferentes ecosistemas en una amplia gama de ambientes y se caracterizan por incluir individuos de crecimiento rápido y capacidad para asimilar una diversa gama de sustratos, preferencialmente en material en descomposición en el suelo, en donde se halla una porción significativa de la biomasa total de hongos (Hoyos-Carvajal, 2012; Kredics et al. 2014). La presencia de especies de *Trichoderma* es modulada por varios factores como el microclima, la disponibilidad de sustratos, así como las interacciones ecológicas complejas (Kubicek et al. 2008; Hoyos-Carvajal y Bissett, 2012; Kredics et al. 2014). Sin embargo, algunas especies son omnipresentes, mientras que otras están limitadas a áreas geográficas específicas (Harman et al. 2004).

Trichoderma es un género de hongos con variados atributos biológicos que lo hacen apto como agente de control biológico y por ello es ampliamente usado para control de fitopatógenos a escala industrial o artesanal, no obstante las generalizaciones sobre el potencial y modo de acción de *Trichoderma* sobre patógenos han desvirtuado su uso exitoso en agricultura, sencillamente porque los caracteres deseables para controlar patógenos se restringen a aislamientos de especies, no a especies de *Trichoderma* o más aún, todas las especies de este género (Hoyos-Carvajal y Bissett, 2012). Por tanto, es un error concluir actividad biológica de este hongo partiendo de estudios no adaptados al medio ni realizados con los aislamientos debidamente formulados o escalados, lo cual puede cambiar su comportamiento y actividad enzimática por silenciamiento o represión de genes en sustratos usados para su producción masiva (Hoyos-Carvajal, 2012).

Características macroscópicas: *Trichoderma* spp. es un organismo que presenta colonias con un rápido crecimiento y ramificación alcanzando las mismas de 7-9 cm

de diámetro luego de tres días, en un principio las colonias presentan un color blanquecino y en unos pocos días adquieren una coloración verde intensa (Romero et al. 2014).

Características microscópicas: las cepas pertenecientes a este género se caracterizan por tener una fase asexual, produciendo así esporas asexuales, en forma mitótica y clonal, no presentando una etapa sexual, al menos las cepas que se utilizan con fines de control biológico. El micelio es septado y hialino, del cual se originan los conidióforos, el tamaño de los mismos es de 62,5 - 69,0 x 3,0 - 4,7 μm , de aspecto aterciopelados irregulares, cortos y muy bifurcados. Las ramas principales del conidióforo producen ramas laterales que pueden presentarse en forma verticilada o no; a su vez estas ramas pueden bifurcarse nuevamente. Todas las ramas primarias y secundarias se levantan aproximadamente sobre 90° con respecto al eje principal. En caso que la bifurcación se presente en forma verticilada, el conidióforo toma un aspecto piramidal (Romero et al. 2014).

Este hongo, tiene la capacidad de producir clamidosporas que son globosas o subglobosas, las cuales son unicelulares, pero pueden fusionarse entre dos o más, ubicadas en la parte terminal o intermedia de las hifas y miden menos de 15 μm de diámetro, con una pared de 1 μm de espesor; éstas son estructuras de resistencia, vitales e importantes para la sobrevivencia del hongo bajo condiciones adversas (Castro y Rivillas, 2012).

1.3.4 Ventajas del uso de *Trichoderma* en la agricultura. Los agentes de biocontrol basados *Trichoderma* spp. son los más exitosos del mundo ya que más del 60% de los biofungicidas registrados utilizados provienen de formulaciones con estos microorganismos, la capacidad de estos hongos para detectar, invadir y destruir otros hongos ha sido la principal fuerza detrás de su éxito comercial como bioplaguicidas (Akansha-Singh et al. 2018). Las ventajas reportadas para este tipo de microorganismos se pueden resumir así:

- ✓ Amplia distribución y plasticidad ecológica relacionada con su capacidad de producir un amplio rango de enzimas líticas para degradar sustratos (Harman et al. 2004).
- ✓ Versátil metabolismo y una alta resistencia a los inhibidores microbianos (Akansha-Singh et al. 2018).
- ✓ Alta capacidad para estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como para combatir una amplia gama de fitopatógenos (Błaszczuk et al. 2014; Waghunde et al. 2016; Stewart y Hill, 2014).
- ✓ Inducen la resistencia sistémica de la planta contra patógenos de raíz y foliares, incluidas bacterias, hongos y Oomycetes (Harman et al. 2004; Shores et al. 2010; Olmedo et al. 2014).
- ✓ Gran habilidad de colonización y asociación con micorrizas, aumentando de

manera significativa la rizosfera del suelo, permitiéndole a las plantas una mayor capacidad de extracción de nutrientes con un alto grado de asimilación (Valdés, 2014; Ghorbanpour et al. 2017).

- ✓ Las cepas de *Trichoderma* spp. son típicamente aplicadas como biopesticidas, bioprotectantes, bioestimulantes y biofertilizantes sobre una amplia variedad de plantas, gracias a que los propágulos de estos hongos pueden ser producidos en grandes cantidades y muy baratadamente, con altas concentraciones y en formulaciones estado líquido (agua o aceite) y en seco (granularmente o con poder disolvente) y además pueden ser almacenadas durante meses sin perder sus efectos benéficos sobre los cultivos (Woo et al. 2006; Harman y Kubicek, 1998; Rao et al. 1998; Romero et al. 2014).

1.3.5 Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp. sobre las plantas.

Harman (2006), hace una importante reseña sobre los mecanismos usados por las especies de este género y denota que la antibiosis, el micoparasitismo y la competencia por recursos (alimento y espacio) además de la promoción de resistencia sistémica y localizada en las plantas, constituyen los mecanismos de acción más importantes de las especies de *Trichoderma*.

1.3.5.1 Mecanismos de acción contra los patógenos. Según una reciente revisión realizada por Akansha-Singh et al. (2018), *Trichoderma* promueve la interacción antagonista con los patógenos por medio de los siguientes modos de acción:

Micoparasitismo: este es uno de los principales mecanismos en la actividad antagónica de estos hongos y envuelven el ataque directo de una especie de hongo sobre otra. Los eventos que ocurren en la interacción fitopatogenos - antagonista son complejos y se resumen en los siguientes: crecimiento quimiotrófico de *Trichoderma* (exudados del patógeno atraen a *Trichoderma* spp.), reconocimiento del patógeno, formación de apresorios, secreción de enzimas hidrolíticas, penetración de las hifas (una vez se ha reconocido al patógeno lo envuelve y se adhiere a las hifas cubriéndolo totalmente) y lisis del patógeno. Este complejo proceso incluye eventos secuenciales, envolviendo el ciclo de formación de apresorios el cual contiene grandes cantidades de solutos osmóticos como el Glicerol e induce la penetración y ataque sobre la maquinaria celular vía producción de enzimas fungitóxicas degradadoras de pared celular (quitinasas, glucanasas y proteasas, entre otras). En los sitios de formación de los apresorios, pueden producirse hoyos que (Harman, 2004; Michel-Aceves et al. 2005).

Según Daguerre et al., (2014), existen entre 20 y 30 genes, proteínas y otros metabolitos envueltos directamente en esta interacción y experimentos gen-gen en el futuro ayudaran consecuentemente a entender las bases de esta interacción (Akansha-Singh et al. 2018; Kumar, 2013).

Antibiosis: es el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas líticas las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y β -1-3-glucanos, de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación. Entre mayor sea la cantidad de productos metabólicos, el poder antagónico se incrementa (Pezet et al. 1999; Michel-Aceves et al. 2005).

Trichoderma spp. puede producir una multitud de compuestos con propiedades antagónicas incluyendo la degradación celular con enzimas como pectinasas, lipasas, amilasas, arabinasa, y proteasas, también, metabolitos volátiles y antibióticos como gliovirina, gliotoxina, viridina, herzianolidos, pyrones, peptaiboles, etileno y aldehído fórmico (Howell, 2003; Harman et al. 2004; Hermosa et al. 2014; Strakowska et al. 2014; Ghorbanpour et al. 2017). En general, se ha encontrado que toda esa cantidad de metabolitos secundarios, enzimas y compuestos volátiles involucrados en el proceso de antibiosis, tienen efecto sobre la apoptosis o muerte celular programada, prevención de la germinación de esporas de hongos, y actividad antagónica o biocontroladora de fitopatógenos de diversos géneros (Akansha-Singh et al. 2018).

Competencia por recursos en la rizosfera: según Howell (2003), la competencia en la rizosfera es importante porque un agente biocontrolador no podrá competir por espacio y nutrientes si este es incapaz de crecer en esta rizosfera. Las cepas de *Trichoderma* crecen cómodamente con el desarrollo del sistema radicular de plantas tratadas siendo agregada al suelo o aplicada como tratamiento en la semilla ya que los exudados radiculares son ricos en fuentes de nutrientes como azúcar, aminoácidos, hierro, vitamina o ácidos orgánicos. La razón más común de la muerte de microorganismos creciendo en la vecindad de cepas de *Trichoderma* es la carencia de nutrientes en la rizosfera colonizada (Akansha-Singh et al. 2018).

1.3.5.2 Mecanismos involucrados en la promoción de crecimiento vegetal.

La promoción del crecimiento por *Trichoderma* ha sido observada en un gran número de cultivos y está ligada con cambios morfológicos y fisiológicos de las etapas vegetativas, incremento en el porcentaje de germinación y vigor de semillas, inducción de resistencia a estrés abiótico y biótico, incremento en la solubilización, absorción y translocación de nutrientes, incremento del desarrollo radicular y en la tasa de metabolismo de carbohidratos, fotosíntesis y mecanismos de defensa (Harman, 2000; Harman, 2006; Harman et al. 2004; Stewart y Hill, 2014; Akansha-Singh et al. 2018). Otros mecanismos pueden agruparse así:

Actividad endofítica y competencia en la rizosfera: alta capacidad de colonizar y competir en la zona rizosférica (Ahmad y Baker, 1988).

Solubilización mineral e incremento de la translocación de nutrientes: Los mecanismos de esta promoción de crecimiento, se asociaron a un incremento en la translocación de minerales y amonio por las raíces de plantas de maíz (Harman y Bjorkman, 2005).

Resistencia inducida contra estrés biótico: las plantas presentan un sistema inmune que es capaz de detectar modificaciones en el ambiente y de crear una respuesta al estímulo la cual es mediada por proteínas de patrones moleculares asociadas con microbios (Microbe-Associated Molecular Patterns, *MAMPs* por sus siglas en inglés). Las hifas de *Trichoderma* spp. poseen la capacidad de liberar proteínas de este tipo, remodelan el sistema inmune vegetal y son reconocidas como un no-patógeno (Zamioudis y Pieterse, 2012).

1.3.6 Estudios sobre cepas de *Trichoderma* en el cultivo de Berenjena. La capacidad biocontroladora de *Trichoderma* spp. al igual que la de actuar como promotor de crecimiento vegetal sobre el cultivo de Berenjena ha sido ya demostrada en estudios previos y está asociada al control directo de uno o más patógenos (Stewart y Hill, 2014) y además a otros factores como se verá a continuación:

Lewis y Larkin (1996), determinaron que formulaciones granulares de *Gliocladium virens* y *Trichoderma* spp. fueron efectivas para reducir significativamente el Damping-off en Berenjena causado por *Rhizoctonia solani*. Rao et al. (1998), bajo condiciones de campo, encontraron que las formulaciones de *T. harzianum* fueron efectivas para producir plántulas más vigorosas bajo el ataque del nematodo agallador *Meloidogyne incognita*, e incrementaron la colonización de raíces y el parasitismo de hembras de *M. incognita* por *T. harzianum*. En un trabajo llevado a cabo bajo condiciones *In vitro* por Narisawa et al., (2002), se encontró que las plántulas inoculadas con *Trichoderma* spp. y otros 7 aislados fúngicos no mostraron síntomas de marchitez por *Verticillium*. También anotan que tampoco se presentaron síntomas internos como decoloración vascular de raíces o hipocotilos.

En investigaciones más recientes, bajo condiciones *In vitro* e *In vivo* se determinó el potencial de aislados seleccionados de *Trichoderma*: *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride* contra el patógeno *Fusarium solani* f. sp. *melongenae*. Todas las cepas mostraron un buen efecto inhibitorio del crecimiento del micelio del patógeno en los cultivos duales, aunque esa efectividad fue diferente entre las mismas cepas evaluadas. La inhibición de *Fusarium oxysporum* por *Trichoderma* se asoció a la secreción de enzimas degradadoras de pared celular tales como quitinasa β -1,3-glucanasa, las cuales ayudan a la colonización y el micoparasitismo sobre el patógeno, también se puede asociar a la producción de metabolitos secundarios tales como glioviridinas, viridinas y gliotoxinas (Abdel-Monaim et al. 2014; Bhadra et al. 2016). Por otra parte, Siddique et al. (2018), mostraron que *Trichoderma harzianum* mostro efectividad contra *Sclerotium rolfisii* agente causal del volcamiento y pudrición de la raíz de la Berenjena bajo condiciones *In vivo*.

Abdel-Monaim et al. (2014), evaluaron cinco cepas de *Trichoderma* sobre parámetros de crecimiento y componentes de rendimiento de berenjena, se comprobó que todas las cepas incrementaron significativamente los parámetros evaluados. *T. viride* resultó ser el tratamiento más efectivo con un incremento de la altura de planta promedio y en el número de ramas por planta con respecto al control en diferentes épocas de siembra.

1.3.7 Antagonismo de *Trichoderma* sobre *Sclerotium rolfsii* como agente causal de la marchitez de la Berenjena. El fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* Sacc. causa enfermedades en los tallos y las raíces de una gran variedad de cultivos y son responsables del volcamiento de plántulas de semillero y pudriciones en etapas de pre y post-emergencia (Adams, 1990; Goldman et al., 1994). Las especies de *Sclerotium* presentan estructuras de resistencia están constituidas por esclerocios que pueden permanecer viables en el suelo hasta 10 años y pueden escapar con facilidad de la acción de los fungicidas de origen sintético (Adams, 1990. Citado por Hoyos-Carvajal et al. 2008). El control con fungicidas de origen sintético se hace difícil debido a que se han de atacar los esclerocios remanentes en el suelo y se debe mantener la acción tóxica en el tiempo (Hoyos-Carvajal et al. 2008).

Sclerotium rolfsii (teleomorfo: *Athelia rolfsii*) y otras siete especies de *Sclerotium* (que de acuerdo a Harlton et al., (1995) y Xu et al., (2010), apoyados en mapas de restricción y análisis filogenético, pueden designarse como variedades subespecíficas de *S. rolfsii*), atacan principalmente los tallos del huésped, los primeros signos de infección, son lesiones de color marrón oscuro en el tallo en o justo debajo del nivel del suelo; el amarillamiento progresivo y la marchitez de las hojas. Después de esto, el hongo produce abundante micelio blanco y esponjoso en los tejidos infectados y en el suelo. Los esclerocios de tamaño relativamente uniforme se producen en el micelio: redondeados y blancos cuando son inmaduros y luego se vuelven de color marrón oscuro a negro (Mullen, 2001).

El hongo ocasionalmente produce basidiosporas (la etapa sexual de la reproducción) en los márgenes de las lesiones y en condiciones húmedas, aunque esta forma no es común, las plántulas son muy susceptibles y mueren rápidamente una vez que se infectan. Las plantas más viejas que han formado tejido leñoso son gradualmente rodeadas por lesiones y finalmente mueren, los tejidos invadidos son de color marrón pálido y suave, pero no acuosos (Mullen, 2001). Gato et al., (2014) indican que el enrollamiento, fragmentación y penetración de las hifas del patógeno son las respuestas durante la interacción del hongo con su antagonista en cultivos duales. Mukherjee et al., (2014), menciona que hongos de este género, son difíciles de controlar debido a su rápida esporulación y fácil dispersión en campo. Sin embargo, su control puede ser llevado a cabo con cepas de *Trichoderma* que posean una alta capacidad de producir conidias en condiciones bióticas o abióticas adversas.

En un reciente estudio llevado a cabo por Siddique et al. (2018), aplicando la cepa *T. harzianum* para el control de la pudrición en Berenjena en condiciones de campo se encontró que el tratamiento tuvo efectividad sobre el control de la enfermedad, con porcentajes incidencia y severidad de 38.43% y 3.60% respectivamente, con respecto al control (sin aplicación de químicos ni bio-agentes) para los mismos parámetros 62.50% y 6.36% respectivamente.

Hoyos-Carvajal et al. (2008), evaluaron la eficacia biológica de ocho aislamientos de *Trichoderma spp.* provenientes de suelos de Colombia para el control de los agentes causales de volcamiento, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, bajo condiciones in vitro y de invernadero. Los análisis *in vitro* mostraron la capacidad antagonista de todos los aislamientos evaluados. Pero en condiciones de invernadero, solo cuatro aislamientos fueron altamente eficaces contra *S. rolfsii* en plantas de frijol en semillero (>90% de reducción de la enfermedad).

Los mismos autores concluyen que el comportamiento micoparasítico de los aislamientos de *Trichoderma spp.* varía según el hongo fitopatógeno, evidenciando una amplia especificidad del antagonista por su sustrato, es decir por el hongo atacado; por lo tanto, es necesario realizar cuidadosas selecciones del aislamiento de *Trichoderma* que se utilice en programas de control de fitopatógenos. En estudios respecto al mecanismo de acción de *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia spp.* y *Sclerotium spp.* se ha encontrado que la interacción inicial entre antagonista y fitopatógeno obedece a la acción de lectinas durante el proceso de reconocimiento y posteriormente se inicia la liberación al medio de diversas enzimas con actividad quitinolítica, glucanolítica, celulolítica y proteolítica) que tienen como finalidad degradar las estructuras del hongo fitopatógeno y después nutrirse de los productos resultantes de la actividad enzimática (Goldman et al. 1994; El-Katatny et al., 2001. Citados por Hoyos-Carvajal et al. 2008).

1.3.8 Estudios de caracterización molecular de cepas de *Trichoderma*. En general, las especies de *Trichoderma* han sido caracterizadas por su rápido crecimiento y morfología. Desde años recientes, la caracterización molecular se ha convertido en una herramienta precisa y sofisticada para múltiples propósitos cuando se trabaja con aislamientos de este género.

Según Sharma y Salwal (2018), los marcadores moleculares tienen un papel vital a la hora de resolver las posiciones taxonómicas y filogenéticas de especies de *Trichoderma* y sus teleomorfos cuando la caracterización morfológica es suficiente para hacer una identificación de los aislamientos. Se sabe que los miembros del género *Trichoderma/Hypocrea* son clasificados usando primeramente reconocimiento morfológico que a su vez se limita si no se conoce la biología de la cepa o al grupo fúngico preciso al que pertenece. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) específica de las regiones ITS1 e ITS2 y del factor de elongación, así como la secuenciación de estas para su comparación

con las secuencias depositadas en *GenBank TrichoBlast* y en otras bases de datos, facilitan la identificación del aislamiento (Martínez et al. 2015).

Los estudios comparativos basados en el fenotipo e información del DNA pueden ayudar a delinear el estado asexual/sexual del ciclo de vida e *Trichoderma/Hypocrea*, además pueden ayudar a determinar la diversidad genética entre cepas, facilitar el análisis comparativo del transcriptoma, detectar cambios durante la interacción del hongo con una especie vegetal, encontrar relaciones filogenéticas entre especies y/o separar las especies de *Trichoderma* por grupos, e incluso encontrar diferencias dentro de aislamientos de una misma especie (Hoyos-Carvajal et al. 2008; Mukherjee et al. 2014; Sharma y Salwal, 2018). Por ejemplo, las secuencias simples repetidas (Single Sequences Repeat, SSRs por sus siglas en inglés) también conocidos como microsatélites son una poderosa herramienta en estudios de genética y taxonomía de poblaciones. Geistlinger et al., (2015) desarrollaron marcadores SSR para *Trichoderma* y así determinaron su diversidad genética.

La información obtenida de las secuencias génicas de cepas de *Trichoderma*, ofrece un mejor entendimiento del micoparasitismo o de la expresión génica envuelta detrás de la capacidad biocontroladora de estas especies. Además, el conocimiento adquirido a través de la caracterización molecular de aislamientos refuerza el desarrollo de cepas mejoradas, más eficientes y ambientalmente favorables para la protección de las plantas (Mukherjee et al. 2014).

Con el fin de conocer qué rango de especies o tipos de aislamientos de *Trichoderma* son antagonistas sobre un organismo en particular y garantizar la calidad en posteriores formulaciones es necesario llevar a cabo pruebas para la identificación del hongo de interés. Con tal finalidad se han utilizado marcadores multisitio que ofrecen información de la especie y permiten hacer un monitoreo a nivel infragenérico (o infraespecífico); tales marcadores incluyen DS-PCR (reacción en cadena de la polimerasa, PCR, de doble estringencia) (Lubeck et al., 1999) y UP-PCR (PCR con iniciadores universales) (Matioli y Brito, 1995). Tanto los marcadores UP-PCR como los DS-PCR son similares a los RAPD (amplificación al azar de fragmentos polimórficos) ya que sin previo conocimiento de la secuencia a amplificar se generan múltiples bandas.

No obstante, la UP-PCR y la DS-PCR utilizan temperaturas de alineamiento relativamente altas (> 53 °C), características que les confieren alta reproducibilidad en los patrones de bandas generados (Hoyos-Carvajal et al. 2008)

Algunas especies del género *Trichoderma* se han caracterizado con el uso de marcadores moleculares para determinar la diversidad genética, se destacan los estudios de: RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) (marcador codominante) por Ali et al., (2009), RAPD (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA), por Kumar et al., (2011), SSR (del inglés Single Sequences

Repeat), por Geistlinger et al. (2015) y AFLP (del inglés Amplified Fragments Length Polymorphism) por Buhariwalla et al., (2005).

En general, la caracterización molecular en especies de *Trichoderma*, por medio del uso de diferentes herramientas biotecnológicas, se ha realizado con el fin de diferenciar aislamientos por su actividad antagónica o biocontroladora, agrupar cepas taxonómicamente y descubrir relaciones filogenéticas entre distintas accesiones (Hoyos-Carvajal et al. 2008; Sharma et al 2009; Kumar et al. 2012; Kannangara et al. 2016; Khedarani y Sinha, 2018).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

Contribuir con el manejo fitosanitario de la marchitez vascular *Sclerotium* sp. con aislados de *Trichoderma* spp., provenientes de suelos agrícolas de Montería (Córdoba, Colombia), que tengan capacidad promotora de crecimiento.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de cepas de *Trichoderma* spp. en suelos de cultivos comerciales de berenjena, en la zona productora de berenjena del departamento de Córdoba.
- Caracterizar macroscópica y molecularmente aislamientos de *Trichoderma* spp., presentes en muestras de suelo provenientes de cultivos de berenjena.
- Evaluar el potencial biocontrolador *In-vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium* sp. y la capacidad promotora de crecimiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en plántulas de berenjena en casa malla.

1.5 LITERATURA CITADA

- Abdel-Monaim, M.F., Zayan S. A., Abdel-Gaid, M. A. y Nassef D. M.T. (2014). Enhancement of Growth Parameters and Yield Components in Eggplant using Antagonism of *Trichoderma spp.* against Fusarium Wilt Disease. *International Journal of Phytopathology*, 3(1), 2348 – 3997.
- Adams, P. (1990). The Potential of Mycoparasites for Biological Control of Plant Diseases. *Annu. Rev. of Phytopathol.*, 28, 59-72. doi: 10.1146/annurev.py.28.090190.000423
- Agronet (2017). Estadísticas de Área, Producción y Rendimientos. Sistema de Estadísticas Agropecuarias. Disponibles en: <http://www.agronet.gov.co/>
- Ahmad, J.S. y Baker, R. (1988). Rhizosphere competence of benomyl-tolerant mutants of *Trichoderma spp.* *Can. J. Microbiol.*, 34(5), 694-696. doi:10.1139/m88-116
- Akansha-Singh, A., Shukla, N., Kabadwal, B.C., Tewari A.K. y Kumar, J. (2018). Review on Plant-*Trichoderma*-Pathogen Interaction. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7(2), 2382 - 2397. doi: 10.20546/ijcmas.2018.702.291.
- Ali, A., Bajwa, R., Mehmood, N., y Jabeen, R. (2009). Molecular Screen of *Trichoderma* Isolates. *Journal of Bio-Science*, 17, 117-122. doi: 10.3329/jbs.v17i0.7117
- Araméndiz, H., Cardona, C., Jarma, A. y Espitia, M. (2008). El cultivo de la Berenjena (*Solanum melongena* L.). 1ª ed. Bogotá, Ed. Produmedios. 152 p.
- Aramendiz-Tatis, H., Cardona-Ayala, C. y Alzate-Román, K. (2017). Prueba de conductividad eléctrica en la evaluación de la calidad fisiológica de semillas en berenjena (*Solanum melongena* L.) *Scientia Agropecuaria*, 8(3), 225 – 231. doi: 10.17268/sci.agropecu.2017.03.05
- Araméndiz-Tatis, H., Cardona–Ayala, C. y Correa-Álvarez, E. (2014). Parámetros genéticos en berenjena (*Solanum melongena* L.). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 17(2), 361-369.
- Bhadra, M., Khair, A., Hossain, M.A, Shamoli, F.A. y Sikder, M. M. (2016). Biological control of wilt of eggplant caused by *Fusarium solani* f. sp. *melongenae*. *Int. J. Expt. Agric.* 6(2), 20-25.
- Błaszczuk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J. y Jedryczka, M. (2014). *Trichoderma spp.*, application and prospects for use in organic farming and industry. *J. Plant Protec. Res.*, 54(4), 309-317.
- Brun, O. y Flórez, E. (2009). Respuesta de la berenjena (*Solanum melongena* L.) a la fertilización del valle del Sinú. Tesis Ingeniero agrónomo, Universidad de Córdoba, Montería. 102 p.
- Buhariwalla, H. K., Srilakshmi, P., Kannan, S., Kanchi, R. S., Chandra, S., Satyaprasad, K., .. y Crouch, J. H. (2005). AFLP Analysis of *Trichoderma spp.* from India Compared with Sequence and Morphological-based Diagnostics. *Journal of phytopathology*, 153(7-8), 389-400. doi: 10.1111/j.1439-0434.2005.00989.x

- Cantero, J., Espitia, L., Cardona, C., Vergara, C. y Araméndiz, H. (2015). Efectos del compost y lombriabono sobre el crecimiento y rendimiento de berenjena (*Solanum melongena* L.) *Rev. Cienc. Agr.* 32(2), 56 – 67.
- Castro, A. y Rivillas, C. (2012). *Trichoderma spp.* Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café. Boletín Técnico. CENICAFE. 33 p.
- Chet, I. y Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 48(1), 37-43.
- Creus, C. (2017). Inoculantes microbianos: piezas de un rompecabezas que aún requiere ser ensamblado. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 207-209. doi: 10.1016/j.ram.2017.07.001
- Daguere, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V. y Steinberg, C. (2014). Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. *Fungal Biology Reviews*, 28(4), 97-125. doi: 10.1016/j.fbr.2014.11.001
- D'arcy, W. G. (1991). The Solanaceae since 1976 with a review of its biogeography. En: Hawkes, J. G., Lester, R. N., Nee, M. y Estrada-R., N. (eds). *Solanaceae III: Taxonomy, chemistry, evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 75-137.
- Druzhinina, I., Kopchinskiy A. y Kubicek, C. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47, 55-64. doi: 10.1007/s10267-006-0279-7
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V. y Kubicek, C.P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(10), 749–759. doi: 10.1038/nrmicro2637.
- El-Katatny, M., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M. A. y Gübitz G.M. (2001). Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 56(1-2), 137-143. doi: 10.1007/s002530100646.
- Esposito, E. y M. Da Silva. (1998). Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.* 24, 89-98.
- Gato, Y., Pérez, Y., Carreras, B., Baró, Y., Quesada, Y. y Ramírez, R. (2014). Actividad antagónica de cepas autóctonas de *Trichoderma spp.* frente a fitopatógenos de suelo. *Fitosanidad*, 18(1), 45-48.
- Gaviria-Hernández, V., Patiño-Hoyos, L. y Saldarriaga-Cardona, A. (2013). Evaluación in vitro de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum spp.*, en mora de castilla. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(1), 67-75.
- Geistlinger, J., Zwanzig, J., Heckendorff, S. y Schellenberg I. (2015). SSR Markers for *Trichoderma virens*: their evaluation and application to identify and quantify root-endophytic strains. *Diversity*, 7(4), 360 - 84. doi: 10.3390/d7040360.
- Ghorbanpour, M., Omidvari, M., Abbaszadeh-Dahaji, P., Omidvar, R. y Kariman, K. (2017), Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases, *Biological Control*, 117. 147-157. doi: 10.1016/j.biocontrol.2017.11.006

- Goldman G. H., Hayes C. y Harman G. E. (1994). Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends Biotechnology*, 12(12), 478-482. doi: 10.1016/0167-7799(94)90055-8
- Guzmán-Guzmán, P., Alemán-Duarte, M.I., Delaye, L., Herrera-Estrella, A. y Olmedo Monfi, V. (2017). Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism, *BMC Genetics* 18(1), 16. doi: 10.1186/s12863-017-0481-y.
- Harlton, C. E., Levesque, C. A., y Punja, Z. K. (1995). Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. *Phytopathology*, 85(10), 1269-1281.
- Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.*, 84(4), 377-393. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.4.377
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190-194. doi: 10.1094/PHYTO-96-0190
- Harman, G. E. y Kubicek, C. P. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor & Francis, London.
- Harman, G., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet y Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Rev. Microbiol.* 2(1), 43-56. doi: 10.1038/nrmicro797
- Harman, G.E. y Bjorkman, T. (2005). Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. En: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*, vol. 2. Taylor & Francis Ltd, London, pp. 229–265.
- Hermosa, R., Cardoza, M.B., Rubio, M.E., Gutiérrez, S. y Monte, E. (2014). Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In: Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I. y Tuohy, M. (Eds.), *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier, The Netherlands, pp. 125-137.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158, 17–25. doi: 10.1099/mic.0.052274-0
- Hernández-Lamasa, C., Cardona-Ayala, C., Vergara-Córdoba, C., Araméndiz-Tatis, H. y Velásquez-Arteaga, R. (2015). Efecto de coberturas y micorrizas nativas sobre el cultivo de berenjena (*Solanum melongena* L.). *Rev. Agron.* 23(1), 7-19.
- Hidangmayum, A. y Dwivedi, P. (2018). Plant Responses to *Trichoderma* spp. and their Tolerance to Abiotic Stresses: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1), 758-766.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87(1), 4-10. doi: 10.1094/PDIS.2003.87.1.4
- Hoyos-Carvajal, L. (2012). *Trichoderma*: Identificación y prospectiva pp. 53-69. En: Martínez L. J. (ed.). *Avances de la investigación agronómica II*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

- Hoyos-Carvajal, L. y Bissett, J. (2012). *Trichoderma*: Especificidad, variabilidad y usos. pp. 11-34. En: Hoyos-Carvajal, L. (ed.). *Trichoderma*: Identificación y prospectiva Enfermedades de plantas: manejo biológico. Universidad Nacional de Colombia; ECOE, Bogotá.
- Hoyos-Carvajal, L.M., Caparro, P., Abramsky, M., Chet, L. y Orduz, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma spp.* contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3), 451-458.
- Hoyos-Carvajal, L.M., Orduz, S. y Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genet. Biol.* 46(9), 615-31. doi: 10.1016/j.fgb.2009.04.006
- Hurtado, M. (2015). Mejora genética de la Berenjena (*S. melongena* L.). Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 290 p.
- Jyotsna, A., Singh, S., Srivastava, R.P., Saxena, A.K. y Arora, D.K. (2008). Growth promotion and charcoal rot management in chickpea by *Trichoderma harzianum*. *J. Plant Prot. Res.* 48(1), 81–92. doi: 10.2478/v10045-008-0009-6
- Kannangara, S., Dharmarathna, R. M. G. C. S. y Jayarathna, D. L. (2017). Isolation, Identification and Characterization of *Trichoderma* species as a Potential Biocontrol Agent against *Ceratocystis paradoxa*. *The Journal of Agricultural Sciences*, 12(1), 51- 62 doi: 10.4038/jas.v12i1.8206
- Khedarani, K. y Sinha, B. (2018). Antagonistic Potential and Molecular Characterization of *Trichoderma spp.* against *Rhizoctonia solani* Infecting Ghost Pepper in Manipur, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7(02), 2085-2093. doi: 10.20546/ijcmas.2018.702.248
- Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. Druzhinina, I. (2014). Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats. pp. 3-24. En: I. G., Gupta, M., Schmoll, A., Herrera-Estrella, R.S., Upadhyay, I. Druzhinina y M. Tuohy, (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier, The Netherlands. Doi: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1.
- Kubicek, C.P., Komon-Zelazowska, M. y Druzhinina, I.S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 9(10), 753–763. Doi: 10.1631/jzus.B0860015.
- Kumar, G., Maharshi, A., Patel, J., Mukherjee, A., Singh, H. B. y Sarma, B. K. (2017). *Trichoderma*: a potential fungal antagonist to control plant diseases. *SATSA Mukhapatra-Annual Technical Issue*, 21, 206-218. Kumar, K., Amaesan, N., Bhagat, S., Madhuri, K. y Srivastava, R. C. (2012). Isolation and Characterization of *Trichoderma spp.* for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. *Indian J. Microbiol*, 52(2), 137–144. Doi: 10.1007/s12088-011-0205-3
- Kumar, S. (2013). *Trichoderma*: A biological control weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 1, 106-121.

- Lewis, J. A. y Larkin, R. P. (1996). Extruded Granular Formulation with Biomass of Biocontrol *Gliocladium virens* and *Trichoderma spp.* to Reduce Damping-off of Eggplant Caused by *Rhizoctonia solani* and Saprophytic Growth of the Pathogen in Soil-less Mix. *Biocontrol Science and Technology* 7(1), 49-60. Doi: 10.1080/09583159731036
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R. y Herrera-Estrella A. (2015). *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci. Hortic.*, 196, 109-123.
- Lubeck, M., I. Alekhina, S. Lubeck, D. Jensen y S. Bulat. (1999). Delineation of *Trichoderma* two different genotypic groups by a highly robust fingerprinting method, UP-PCR, and UP-PCR product cross-hybridization. *Mycol. Res.* 103, 289-298.
- Mamani de Marchese, A. y Filippone, M. P. (2018). Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible. *Revista agronómica del noroeste argentino.* 38(1), 9-21.
- Martínez, B., Infante, D., y Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30, 11-22.
- Matioli, S. y Brito. R. (1995). Obtaining genetic markers by using double – stringency PCR with microsatellites and arbitrary primers. *BioTechniques* 19, 752-758.
- Matsouri F., Björkman, T. y Harman, G.E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100, 1213-1221.
- Melo, A., Ariza, P., Lissbrant, S. y Tofiño, A. (2015). Evaluación de agroquímicos-bioinsumos para el manejo sostenible del frijón en la costa Caribe colombiana. *Agronomía Colombiana*, 33(2), 203 -211.
- Mena-Rodríguez, E., Ortega-Cuadros, M., Merini, L., Melo-Ríos, A. E. y Tofiño-Rivera, A. (2018). Efecto de agroinsumos y aceites esenciales en el suelo de hortalizas en el Caribe colombiano. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 19(1), 103-124. doi: 10.21930/rcta.vol19_num1_art:535.
- Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A. y Mukherjee, P. K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, 32(2), 62-85. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.12.001>
- Michel-Aceves, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R. y Ochoa-Moreno, M. E. (2005). Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma spp.*, en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* in vitro. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(2), 273-278
- Mukherjee, A. K., Sampath Kumar, A., Kranthi, S. y Mukherjee P. K. (2014). Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains: isolation, evaluation and formulation. *3 Biotech.*, 4(3), 275 – 281. doi: 10.1007/s13205-013-0150-4
- Mullen, J. (2001). Southern blight, Southern stem blight, White mold. The Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-I-2001-0104-01.

- Muthu, K. A., y Sharma, P. (2011). Molecular and morphological characters: An appurtenance for antagonism in *Trichoderma* spp. *African Journal of Biotechnology*, 10(22), 4532-4543. doi: 10.5897/AJB10.2089
- Narisawa, K., Kawamata¹, H., Currah, R. S. y Hashiba, T. (2002). Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *European Journal of Plant Pathology*, 108(2), 103–109. doi: 10.1023/A:101508031
- Olmedo, V., y Casas-Flores, S. (2014). Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture. pp. 429-453. En: Gupta, I. G., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina I. y Tuohy, M. (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier, The Netherlands. doi: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1.
- Pezet, R., Pont, V. y Tabacchi, R. (1999). Simple analysis of 6-pentylalpha-pyrone, a mayor antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytoch. Anal.*, 10(5), 285-288.
- Ram, R. M., Keswani, C., Bisen, K., Tripathi, R., Singh, S. P. y Singh, H. B. (2018). Biocontrol technology: eco-friendly approaches for sustainable agriculture. En D. Barh, y V. Azevedo. (Eds.). *Omics technologies and bio-engineering* (pp. 177-190). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815870-8.00010-3>
- Rao, M.S., Parvatha, P. y Naguesh, M. (1998). Evaluation of plant based formulations of *Trichoderma harzianum* for the management of *Meloidogyne incognita* on eggplant. *Nematol. medit.*, 26, 59 – 62.
- Rehman, S.U., Lawrence, R., Kumar, E. J., Talat, M. A., Ganie, S. A., Dar W. A. y Bhat. J. A. (2013). Eco-friendly management of root-rot of chilli caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. *African J. of Agricultural Res.* 8(21), 2563-2566.
- Romero, G., Olivera-Costa, M. y Rodríguez. D. (2014). *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico. Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay. 65 p.
- Sambamurty, S. (2005). Taxonomy of Angiosperms. I.K. International Pvt. Ltd. Departament of Botany. Sri Venkateswara, College South Campus, Delhi University. New Delhi.
- Samuels, G.J., Ismaiel, A., Mulaw, T.B., Szakacs, G., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Jaklitsch, W.M., (2012). The *Longibrachiatum* clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity* 55, 77–108.
- Sarrocco, S., Guidi, L., Fambrini, S., Des'Innocenti, E. y Vannacci, G. (2009). Competition for cellulose exploitation between *Rhizoctonia solani* and two *Trichoderma* isolated in the decomposition of wheat straw. *Journal of Plant Pathology*, 91(2), 331-338.
- Sharma, K., Mishra, K. A. y Misra, R. S. (2009). Morphological, Biochemical and Molecular Characterization of *Trichoderma harzianum* Isolates for their Efficacy as Biocontrol Agents. *J. Phytopathology* 157(1), 51–56. doi: 10.1111/j.1439-0434.2008.01451.x

- Sharma, V. y Salwal, R. (2017). Molecular Markers and Their Use in Taxonomic Characterization of *Trichoderma* spp. pp. 37-52. En: Singh, B. P. y Gupta, V. K. (Eds.). *Molecular Markers in Mycology: Diagnostics and Marker Developments*. Springer Nature, Switzerland. doi: 10.1007/978-3-319-34106-4
- Shoresh, M., Harman, G.E. y Mastoury, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Ann. Rev. Phytopathol.* 48(1), 21–43. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114450.
- Siddique, M. N. A., Ahmmed, A. N. F., Mazumder, M. G. H., Jahan, N., y Islam, M. R. (2018). Management of Foot and Root Rot Disease of Eggplant Caused by *Sclerotium rolfsii* under *In vivo* Condition. *Sci. Agri.* 21(3), 98-101. doi: 0.15192/PSCP.SA.2018.21.3.98101.
- Stewart, A. y Hill, R. (2014). Applications of *Trichoderma* in Plant Growth Promotion. pp: 415-425. En: Gupta, I. G., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina I. y Tuohy, M. (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier, The Netherlands. doi: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1.
- Strakowska, J., Błaszczuk, L. y Chetkowski, J. (2014). The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this Fungus. *J. Basic Microb.*, 54, 1-12. doi: 10.1002/jobm.201300821.
- Tofiño, A., Cabal, D., y Gil, L. (2012). Análisis de componentes del sistema productivo de aguacate, con incidencia probable de *Phytophthora* en Cesar, Colombia. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 16(2), 63-90.
- Tofiño, A., Velásquez, A. y Zapata, M. (2016). Indicadores edafológicos del cultivo de fríjol en el Caribe seco colombiano: una estrategia in situ. Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- Valdés, E. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. *Agroecosistemas*, 2(1), 254 – 264.
- Vera-Núñez, J. A., Luna-Martínez, F., Barcos-Arias, M. S., Ávila-Miranda, M. E., Grageda-Cabrera, O. A. y Peña-Cabriales, J. J. (2019). Enhancing 15 N-uptake in maize (*Zea mays* L.) by native *Trichoderma* spp. strains in Central Mexico. DOI: 10.5897/AJB2017.16332
- Waghunde, R. R., Shelake, R. y Sabalpara, A. N. (2016). *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research*, 11(22), 1952-1965. doi: 10.5897/AJAR2015.10584
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M. y Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96(2), 181-185. doi: 10.1094/PHYTO-96-0181
- Xu, Z., Harrington, T., Gleason, M. L. y Batzer, J. C. (2010). Phylogenetic placement of plant pathogenic *Sclerotium* species among teleomorph genera. *Mycologia*, 102(2), 337-346. doi: 10.3852/08-189
- Youssef, M. A. y Eissa, F. M. (2014). Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review. *J Biotechnol Pharm Res.* 5(1), 1-6.

- Zachow, C., Fatehi, J., Cardinale, M., Tilcher, R. y Berg, G. (2010). Strainspecific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugar beet. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74(1), 124-135. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00930.x
- Zambrano-Moreno, D. C., Rodríguez, R., Strahlen Pérez, M. V. y Bonilla Buitrago, R. R. (2015). Industria de bioinsumos de uso agrícola en Colombia. *Revista U.D.C.A Acta & Divulgación Científica.* 18(1), 59-67.
- Zamioudis, C. y Pieterse, C. M. J. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 25(2), 139-150. doi: 10.1094/MPMI-06-11-0179.

CAPÍTULO II

**TOMA DE MUESTRA Y AISLAMIENTO DE CEPAS
DE *Trichoderma* spp. DE SUELOS CULTIVADOS
CON BERENJENA EN CÓRDOBA**

**ISOLATION OF *Trichoderma* spp. STRAINS FROM
SOILS CULTIVATED WITH EGGPLANT IN
CÓRDOBA**

RESUMEN

Trichoderma spp. es una especie de hongo cosmopolita que habita en la rizosfera del suelo, cuenta con un alto potencial biocontrolador en programas de manejo integrado de plagas y enfermedades. En este capítulo se presentan los resultados de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de la rizosfera de plantas de Berenjena, establecidas en lotes destinados para la producción comercial en Córdoba. Se priorizaron 14 campos productivos de berenjena distribuidos en los municipios de Cereté, San Pelayo y Montería; en cada lote se tomaron dos muestras de suelo rizosférico a 0,30 m de distancia del tallo de la planta y de 0 a 0,2 m de profundidad, las cuales se homogeneizaron para formar una muestra compuesta de cada lote. El aislamiento de las cepas de *Trichoderma* spp, se realizó usando la técnica de dilución serial de 10^3 , consistente en la reducción progresiva, paso a paso, de la concentración de suelo rizosférico en agua destilada. Las poblaciones del hongo fueron determinadas por su forma y color con base a claves pictóricas. Cada cepa fue purificada en el medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y caracterizada morfológica y molecularmente. Se aislaron 10 cepas: seis en Cereté, dos en Tierralta y San Pelayo, respectivamente. En el municipio de Montería, no se encontró el hongo. Esto permite inferir que, en la zona productora de berenjena del departamento de Córdoba, existen diversidad de *Trichoderma* spp. adaptadas a los suelos de lotes comerciales de berenjena. que pueden tener propiedades biocontroladoras y/o promotoras de crecimiento de esta hortaliza.

Palabras claves: Microorganismos nativos, aislado, rizosfera, medio selectivo.

ABSTRACT

Trichoderma spp. It is a species of cosmopolitan fungus that lives in the rhizosphere of the soil, it has a high biocontroller potential in integrated pest and disease management programs. The objective of this chapter was to isolate strains of *Trichoderma* spp. of the rhizosphere of Eggplant plants, established in lots destined for commercial production in Córdoba. 14 productive aubergine fields distributed in the municipalities of Cereté, San Pelayo and Montería were prioritized; In each batch, two rhizospheric soil samples were taken at 0.30 m distance from the plant stem, which were homogenized and processed for the extraction and identification of *Trichoderma* spp. The populations of the fungus were determined by their shape and color based on pictorial keys. At least 10 strains were isolated in three of the four municipalities studied, in Cereté the highest number of strains was found (6), followed by Tierralta (2) and San Pelayo (2). The absence of strains of *Trichoderma* spp. In the lots sampled in Montería, it could be associated with the time and method of sampling, methods of processing the samples in the laboratory, and time spent in the process from the extraction of the sample in the field. The isolates of *Trichoderma* spp. found in this chapter are essential for later studies of similarity and identification of native species, likewise, in the selection of the best biocontroller strains of *Sclerotium* spp. and growth promoters.

Key words: Native microorganisms, isolated, rhizosphere, selective medium.

2.1 INTRODUCCIÓN

En Colombia, al igual que otros países, ha aumentado el interés por el uso de especies con potencial biocontrolador para programas de manejo integrado de plagas y enfermedades (Zambrano-Moreno et al. 2015). No obstante, los estudios sobre aislamientos de cepas nativas de este hongo, son escasos (Melo et al. 2015; Smith et al. 2013; Hoyos-Carvajal y Bisset, 2012; Hoyos-Carvajal et al. 2008).

Las cepas de *Trichoderma* spp. se pueden aislar teóricamente de casi todos los tipos de campos agrícolas. Las especies comúnmente aisladas de los suelos son en su mayoría especies oportunistas conocidas en todo el mundo (Atanasova, 2014). Generalmente la mayoría de estas especies presentan gran variabilidad genética, lo que les confiere características morfométricas divergentes y dependientes de la zona geográfica de donde se aíslan (Kredics et al. 2014; Smith et al. 2013; Hoyos-Carvajal et al. 2009). Este hongo es un componente ubicuo y a menudo predominante de la micoflora en el suelo, material descompuesto, la materia orgánica y el ecosistema rizosférico de todas las zonas climáticas como saprófitos. Estas características, además de su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores, han dotado de notable éxito a las formulaciones y biopreparados que de ellas se derivan (Valdés, 2014).

En el departamento de Córdoba, son pocos los reportes sobre el uso de cepas nativas de *Trichoderma* en el control biológico de fitopatógenos y su uso como estimuladores de crecimiento de plantas. Es por ello que el objetivo del presente capítulo fue determinar la presencia de cepas de *Trichoderma* spp. de la rizosfera de plantas de Berenjena, establecidas en lotes comerciales en la zona productora de esta hortaliza.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Localización y época de evaluación. Este estudio constó de una parte de campo y una de laboratorio. Las labores en campo se realizaron en lotes con producción de berenjena del departamento de Córdoba, en los municipios de Montería (8°44'52.73" latitud N y 75°52'53.15" longitud O), Cereté (8° 52' 59" latitud N, 75° 46' 59" longitud O), San Pelayo (8° 52' 59" latitud N, 76° 4' 1" longitud O) y Tierralta (8° 58' 1" latitud N, 75° 51' 0" longitud O).

La fase de laboratorio se efectuó en el área experimental de la Universidad de Córdoba (municipio de Montería), ubicada a los 8° 48" latitud N y 75°52" longitud O con una elevación de 15 m.s.n.m. El área de entorno de la zona presenta una precipitación media anual de 1200 mm, temperatura promedio de 28°C, brillo solar de 1800 horas luz/año y una humedad relativa del 84% (Palencia et al. 2006).

2.2.2. Toma de muestras en campo. El muestreo se realizó en la zona productora de berenjena de los municipios de Montería, Cerete, San Pelayo y Tierralta. En cada lote se tomaron 5 submuestras de suelo de aproximadamente 500 gramos cada una, siguiendo la metodología descrita por Martyniuk y Martyniuk (2003) y Tejera et al. (2005). Las muestras se tomaron a 0,30 m de distancia del tallo de la planta y a una profundidad de 0.20 m, usando un barreno de 2,5 cm de diámetro y 0,3 m de largo. Las submuestras de suelos fueron mezcladas para constituir una muestra por cada lote. Adicionalmente, se tomaron muestras de plantas con síntomas de marchitez y signos de *Sclerotium* spp. Ambas muestras fueron empacadas, refrigeradas y posteriormente procesadas en el laboratorio de Fitopatología adscrito a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba.

2.2.3. Análisis de suelos y georreferenciación. 14 lotes de cultivos comerciales de berenjena en el departamento de Córdoba fueron georreferenciados con el uso del equipo GPS garminly neto. Todas las muestras recolectadas en campo fueron empacadas y posteriormente analizadas en el área de Física de Suelos del Laboratorio de Suelos y Aguas de la Universidad de Córdoba donde se realizaron análisis granulométricos de las mismas por el método de Bouyoucos/Hidrómetro con el fin de definir las clases texturales de cada lote muestreado (IGAC, 2006).

2.2.4. Procesamiento de muestras. Las muestras de suelo se procesaron utilizando la metodología de dilución en serie de 10^3 . Para ello, se pesaron 100 g de suelo y se disolvieron en 100 ml de agua hasta quedar homogenizados. Posteriormente con una micropipeta se tomaron 1000 μ l de solución y se pasaron a tubos de ensayos con agua estéril destilada a una medida de 10 ml, teniendo en cuenta la técnica descrita por Nelson et al. (1983).

2.2.5. Obtención de aislamientos y purificación de los hongos. Los aislamientos de *Sclerotium* spp., se obtuvieron de plantas afectadas en campo, de las cuales se

tomaron raíces y la parte del tallo con síntomas. Se cortaron fragmentos del tejido afectado, de 0,5 a 1 cm de longitud y 0,5 de ancho, aproximadamente. Estos fueron lavados con agua de grifo durante 2 minutos. Posteriormente, fueron colocados en una solución de agua e hipoclorito de sodio al 3%, en agitación durante 3 minutos. Las muestras fueron secadas en papel absorbente a temperatura ambiente y transferidos a medio Papa Dextrosa Agar (PDA). Fracciones del medio con crecimiento puro del hongo, fueron pasados a medio PDA, hasta obtener crecimientos puros del hongo.

2.2.6. Identificación de los aislamientos. A continuación, las especies de *Trichoderma* se identificaron mediante observaciones microscópicas utilizando las descripciones de Bisset (1991) y las claves de identificación de Barnett y Hunter (1972) considerando características como la textura del micelio, formación de anillos concéntricos y pigmentación de conidias.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. El número de cepas aisladas de los suelos cultivados con Berenjena se aprecia en la Tabla 2.2. El municipio con mayor número de cepas aisladas fue el de Cereté (6), mientras que los suelos muestreados en los municipios de Tierralta y San Pelayo se encontraron dos cepas en cada uno de estos. Para el caso del municipio de Montería, no se encontraron aislamientos.

La presencia de estas cepas en los municipios muestreados, sugiere la posibilidad de encontrar organismos antagonistas de hongos fitopatógenos asociados a los cultivos de Berenjena de estas zonas, y una actividad simbiótica entre el cultivo y los hongos de importancia relativa, puesto que ya se ha demostrado que las especies de *Trichoderma* pueden formar asociaciones íntimas con las raíces de las plantas, proporcionando un nivel endémico de control biológico o estimulando el crecimiento de las plantas mediante la producción de formas solubles de nutrientes minerales y metabolitos promotores del crecimiento (Hoyos-Carvajal et al. 2009; Smith et al., 2013). La presencia de este tipo de hongos en zonas con diferencias agroclimáticas claras, obedecen a que este es un hongo cosmopolita del suelo que interactúa mucho con el sistema radicular, posee alta diversidad metabólica y características metabólicas parcialmente únicas, que pueden explicar su amplia distribución en diferentes hábitats (Samaniego-Fernández et al., 2018; Kredics et al., 2014b).

La ausencia de cepas de *Trichoderma* spp. en los suelos de Montería, puede estar asociada a condiciones edafológicas o de manejo del cultivo, que han impedido la adaptación del hongo. Adicionalmente, factores como el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el procesamiento de esta, pudo afectar la presencia de este (Hoyos-Carvajal et al. 2009; Kumar et al., 2017; Sharma et al., 2019).

Los suelos de los sistemas de cultivos muestreados en el municipio de Cereté presentaron en su mayoría, texturas de tipo Franco Arcillo Limosa (FARL) y Franco Arcillosa (FAR). Por su parte, las cepas aisladas en Tierralta provienen de suelos con textura Arcillo Limosa (ArL) y en San Pelayo, la predominancia granulométrica del suelo fue Franco Arcillosa (Far). La presencia de cepas de *Trichoderma* en suelos de diferente textura ya ha sido reportada en diversos estudios de aislamientos (Sariah et al., 2005; Hagn et al., 2007; Okoth et al., 2009; Amir-Ahmadi et al., 2017), en ellos, se ha intentado explicar las diferencias propias de los componentes del suelo y su efecto sobre la distribución geográfica, la capacidad antagonista en el control de fitopatógenos y la capacidad promotora de crecimiento de dichas cepas.

Tabla 2.1. Aislamientos y procedencias de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de cultivos de Berenjena en Córdoba, Colombia.

Cepa N°	Identificación	Procedencia (Municipio)	Textura del suelo	%A	%L	%Ar	Coordenadas geográficas
1	T002	Cereté	FAr	21,2	40,7	38,1	
2	T003		FArL	17,9	44,0	38,1	
3	T004		FArL	19,5	49,2	31,3	8° 52' 59" latitud N
4	T005		Ar	17,7	39,2	43,1	75° 46' 59" longitud O
5	T008		Far	25,1	40,1	37,3	
6	T0010		Far	26,2	37,4	36,4	
7	T001	Tierralta	ArL	11,2	40,8	40,8	8° 58' 1" latitud N
8	T007		ArL	10,1	39,8	40,1	75° 51' 0" longitud O
9	T006	San Pelayo	Ar	14,5	35,7	49,7	8° 52' 59" latitud N
10	T009		ArL	7,9	40,7	51,4	76° 4' 1" longitud O

2.4 CONCLUSIONES

En la zona productora de berenjena del departamento de Córdoba, se encuentran cepas de *Trichoderma*, adaptadas a las condiciones edafológicas y al manejo agronómico del cultivo.

2.5 LITERATURA CITADA

- Akansha-Singh, A., Shukla, N., Kabadwal, B.C., Tewari A.K. y Kumar, J. (2018). Review on Plant-*Trichoderma*-Pathogen Interaction. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7(2), 2382 - 2397. doi: 10.20546/ijcmas.2018.702.291.
- Amir-Ahmadi, N., Moosavi, M. R. y Moafpourian, G. (2017). Effect of soil texture and its organic content on the efficacy of *Trichoderma harzianum* (MIAU 145 C) in controlling *Meloidogyne javanica* and stimulating the growth of kidney beans. *Biocontrol science and technology*, 27(1), 115-127.
- Atanasova, L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. En I. G., Gupta, M., Schmoll, A., Herrera-Estrella, R.S., Upadhyay, I. Druzhinina y M. Tuohy, (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 25-40). Elsevier, The Netherlands. Doi: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1.
- Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V. y Kubicek, C.P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(10), 749–759. doi: 10.1038/nrmicro2637.
- Friedl, M. A. y Druzhinina, I. S. (2012). Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology*, 158(Pt 1), 69.
- Hagn, A., Wallisch, S., Radl, V., Munch, J. C. y Schloter, M. (2007). A new cultivation independent approach to detect and monitor common *Trichoderma* species in soils. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1), 86-92.
- Hoyos-Carvajal, L. y Bissett, J. (2012). *Trichoderma*: Especificidad, variabilidad y usos. pp. 11-34. En: Hoyos-Carvajal, L. (ed.). *Trichoderma: Identificación y prospectiva Enfermedades de plantas: manejo biológico*. Universidad Nacional de Colombia; ECOE, Bogotá.
- Hoyos-Carvajal, L.M., Caparro, P., Abramsky, M., Chet, L. y Orduz, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma spp.* contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3), 451-458.
- Hoyos-Carvajal, L.M., Orduz, S. y Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genet. Biol.* 46(9), 615-31. doi: 10.1016/j.fgb.2009.04.006
- Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. Druzhinina, I. (2014a). Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats. pp. 3-24. En Gupta, I. G., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina I. y Tuohy, M. (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier, The Netherlands. Doi: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1.
- Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. y Druzhinina, I. (2014b). Biodiversity of the genus *Hypocrea/Trichoderma* in

- different habitats. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 3-24). Elsevier. The Netherlands. Doi: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1.
- Kumar, G., Maharshi, A., Patel, J., Mukherjee, A., Singh, H. B. y Sarma, B. K. (2017). *Trichoderma*: a potential fungal antagonist to control plant diseases. *SATSA Mukhapatra-Annual Technical Issue*, 21, 206-218.
- Meincke, R., Weinert, N., Radl, V., Schloter, M., Smalla, K. y Berg, G. (2010). Development of a molecular approach to describe the composition of *Trichoderma* communities. *Journal of microbiological methods*, 80(1), 63-69.
- Mukherjee, A. K., Kumar, A. S., Kranthi, S. y Mukherjee, P. K. (2014). Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains: isolation, evaluation and formulation. *3 Biotech*, 4(3), 275-281.
- Okoth, S. A., Okoth, P. y Muya, E. (2009). Influence of soil chemical and physical properties on occurrence of *Trichoderma* spp. In Embu, Kenya. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 11(2), 303-312.
- Samaniego-Fernández, L. M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A. J. y Placeres-Espinosa, I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. *Revista de Protección Vegetal*, 33(3), 1-11.
- Sariah, M., Choo, C. W., Zakaria, H. y Norihan, M. S. (2005). Quantification and characterisation of *Trichoderma* spp. from different ecosystems. *Mycopathologia*, 159(1), 113-117.
- Sharma, S., Kour, D., Rana, K. L., Dhiman, A., Thakur, S., Thakur, P., ... y Yadav, A. N. (2019). *Trichoderma*: biodiversity, ecological significances, and industrial applications. In *Recent advancement in white biotechnology through fungi* (pp. 85-120). Springer, Cham.
- Smith, A., Beltrán, C. A., Kusunoki, M., Cotes, A. M., Motohashi, K., Kondo, T., & Deguchi, M. (2013). Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of general plant pathology*, 79(1), 74-85.
- Tofiño, A., Velásquez, A. y Zapata, M. (2016). Indicadores edafológicos del cultivo de frijol en el Caribe seco colombiano: una estrategia in situ. Mosquera, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- Valdés, E. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. *Agroecosistemas*, 2(1), 254 – 264.

CAPÍTULO III

**CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA Y MOLECULAR
DE AISLAMIENTOS DE *Trichoderma* spp.**

**MORPHOMETRIC AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF *Trichoderma* spp. STRAINS**

RESUMEN

El objetivo del estudio fue caracterizar morfológica, morfométrica y molecularmente aislamientos de *Trichoderma* spp., presentes en muestras de suelo provenientes de cultivos de berenjena. A partir de 10 cepas aisladas de lotes productores en Cereté, San Pelayo y Tierralta, se realizó un análisis morfológico mediante observaciones microscópicas utilizando las claves de identificación de Barnett y Hunter (1972) y las descripciones de Bisset (1991); también se midió el diámetro medio de crecimiento (cm) dentro de discos de Petri a las 24, 48, 72 y 96 horas de sembrado en medio PDA. Posteriormente se realizó la extracción de ADN (kit de purificación de ADN genómico Wizard®), amplificación del genoma mediante el kit PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) y los primers ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' y ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3', visualización y determinación de tamaño de la amplificación mediante electroforesis, determinación de la especie por medio de la secuenciación del DNA y posterior lectura con el software 4Peks cada secuencia se introdujo en la base de datos pública GenBank del NCBI y se compararon con otras secuencias depositadas. El color de las colonias varió de blanco verdoso a verde oscuro. Morfológicamente, la formación de anillos concéntricos dentro del medio de crecimiento también se adoptó como parámetro de caracterización entre las cepas. El diámetro medio de la colonia alcanzó los 9 cm a las 96 horas después de la siembra en cámara húmeda. La caracterización molecular permitió clasificar eficientemente los 10 aislados; T001 corresponde a la especie *Trichoderma lixii* (99% de similaridad), T002, T003, T004, T006 y T009 corresponden a *Trichoderma* sp., T005 corresponde a *Trichoderma virens* (98% de similaridad), T007 y T008 corresponden a *Trichoderma asperellum* (97% y 98% de similaridad respectivamente). Se logró evidenciar similitudes genéticas en las cepas de *Trichoderma* encontradas en el departamento de Córdoba, con cepas halladas en Países bajos, Alemania y China, reflejando de esta manera una alta diversidad genética.

Palabras clave: Amplificación de genes, secuenciación de nucleótidos, ADN, clasificación, caracterización.

ABSTRACT

The objective of the study was to characterize morphologically, morphometrically and molecularly isolates of *Trichoderma* spp., Present in soil samples from eggplant crops. From 10 strains isolated from producing lots in Cereté. San Pelayo and Tierralta, a morphological analysis was carried out through microscopic observations using the identification keys of Barnett and Hunter (1972) and the descriptions of Bisset (1991); The mean growth diameter (cm) was also measured within Petri dishes at 24, 48, 72 and 96 hours of seeding in PDA medium. Subsequently, DNA extraction (Wizard® genomic DNA purification kit), genome amplification using the PCR Master Mix (2X) kit (Thermo Scientific) and the ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' and ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3', visualization and size determination of the amplification by electrophoresis, determination of the species by means of DNA sequencing and subsequent reading with the 4Peks software, each sequence was entered in the GenBank public database of the NCBI and they were compared with other deposited sequences. The color of the colonies ranged from greenish white to dark green. Morphologically, the formation of concentric rings within the growth medium was also adopted as a characterization parameter between the strains. The mean diameter of the colony reached 9 cm at 96 hours after sowing in a humid chamber. The molecular characterization allowed to efficiently classify the 10 isolates; T001 corresponds to the *Trichoderma lixii* species (99% similarity), T002, T003, T004, T006 and T009 correspond to *Trichoderma* sp., T005 corresponds to *Trichoderma virens* (98% similarity), T007 and T008 correspond to *Trichoderma asperellum* (97% and 98% similarity respectively). It was possible to show genetic similarities in the *Trichoderma* strains found in the department of Córdoba, with strains found in the Netherlands, Germany and China, thus reflecting a high genetic diversity.

Key words: Gene amplification, nucleotide sequencing, DNA, classification, characterization.

3.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, aún se utilizan aspectos morfológicos para la ubicación taxonómica de las especies, pero estos resultan insuficientes y se recurre al uso de otras técnicas como son los estudios fisiológicos, de compatibilidad vegetativa y de herramientas moleculares, los cuales contribuyen a la identificación específica y certera (Martinez et al., 2015).

Trichoderma spp. es un hongo cosmopolita común en diferentes biotopos y muestra diferentes interacciones con los componentes del ecosistema en donde habita (Mokhtari et al., 2017). Múltiples perfiles antagónicos contra patógenos del suelo de diferentes cepas de este género fúngico ya han sido detallados por varios autores en todo el mundo (Hirpara et al., 2017; Filizola et al., 2019; Hewedy et al., 2020), no limitado a este modo de acción, el incremento de la resistencia sistémica a factores bióticos y abióticos en las plantas, así como la promoción del crecimiento vegetal en su huésped, también han sido las principales razones que han invocado al uso generalizado de *Trichoderma* en la agricultura y más aún, en aquella con enfoque orgánico (Bisen et al., 2016; Hidangmayu y Dwivedi, 2018).

Los métodos tradicionales definieron las especies sobreestimadas, mientras que aquellas en apariencia de micelio o aquellas que tienen un crecimiento lento en cultivo se pasan por alto en su mayoría (Davet y Rouxel 1997; Siddiquee, 2017). En la actualidad, aún se utilizan aspectos morfológicos para la ubicación taxonómica de las especies de *Trichoderma*, pero estos resultan insuficientes y por sí solos pueden ser propensos a errores en las identificaciones de este género, por lo que se recurre al uso de otras técnicas como son los estudios fisiológicos, de compatibilidad vegetativa y de herramientas moleculares, los cuales contribuyen a la identificación específica y certera (Martinez et al., 2015; Kuhls et al., 1995).

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Localización y época de evaluación. Este estudio se efectuó en el área experimental de la Universidad de Córdoba (municipio de Montería), ubicada a los 8° 48" latitud N y 75°52" longitud O con una elevación de 15 m.s.n.m. El área de entorno de la zona presenta una precipitación media anual de 1200 mm, temperatura promedio de 28°C, brillo solar de 1800 horas luz/año y una humedad relativa del 84% (Palencia et al. 2006).

3.2.2 Recolección de muestras en campo. Se muestrearon 14 lotes de cultivos comerciales de berenjena en el departamento de Córdoba y se georreferenciaron utilizando el equipo GPS garminly neto (Tabla 2.1). En cada lote se tomaron 5 submuestras de suelo rizosférico a 0.30 m de distancia del tallo de la planta y a una profundidad de 0.20 m y de aproximadamente un 500 g cada una, este muestreo se hizo en forma de zigzag utilizando un barreno metálico y seleccionando aquellos sitios siguiendo la metodología descrita por Martyniuk y Martyniuk (2003) y Tejera et al. (2005).

3.2.3 Procesamiento en laboratorio. Las submuestras de suelo colectadas se homogeneizaron, empacaron y se dispusieron bajo refrigeración con el fin de conservar la integridad de los posibles aislamientos. Posteriormente se procesaron en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Córdoba en la Facultad de Ciencias Agrícolas.

3.2.4 Caracterización morfométrica de las cepas. A continuación, se registró la morfología de las especies de *Trichoderma* mediante observaciones microscópicas utilizando las claves de identificación de Barnett y Hunter (1972) y las descripciones de Bisset (1991), considerando características como la textura del micelio, formación de anillos concéntricos en medio PDA y pigmentación de conidias. Después se trasladó asépticamente a medio de agar papa dextrosa (PDA) cada cepa, éstas se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ para propiciar crecimiento de micelios. Se midió el diámetro medio de crecimiento (cm) de este último dentro de los discos de Petri a las 24, 48, 72 y 96 horas después de cultivado con el uso de una regla graduada.

3.2.5 Caracterización e identificación molecular de aislamientos. Con el fin de identificar el género y la especie de cada uno de los aislamientos, se seleccionaron previamente las cepas con mejor crecimiento radial y se prosiguió con el siguiente esquema de secuenciación molecular;

3.2.5.1. Extracción de ADN. Para la extracción del ADN se utilizó el kit de purificación de ADN genómico Wizard® (Promega, USA), siguiendo el protocolo para organismos fúngicos. Las muestras de DNA fueron cuantificadas usando un

espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific), mediante electroforesis con gel de agarosa al 1%, el cual fue retirado una vez terminó la corrida y revelado en un transiluminador Dyna Ligth de luz ultravioleta. Posteriormente se pasó a un sistema fotodocumentador (ENDURO™ GDS Gel Documentation System) en la Universidad de Córdoba, Sede central Montería-Córdoba, con la finalidad de visualizar las macromoléculas separadas en función de su tamaño y carga.

3.2.5.2. Amplificación del genoma fúngico. La presencia de genes de los hongos se determinó en cada uno de los aislamientos usando la amplificación del gen *Its* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se utilizó el kit PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) y los primers ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' y ITS3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' descritos por White et al., (1990), cada fragmento amplificado incluyó también el gen 5.8 S del ADN_r, con el programa de PCR mostrado en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Programa de PCR para amplificación de ADN fúngico con los primers universales *Its4* e *Its3*.

Paso	Tiempo	Temperatura	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	5:00 min	95°C	1
Desnaturalización	0:30 s	95°C	
Anillamiento	0:30 s	55°C	35
Extensión	1:00 min	72 °C	
Extensión final	7:00 min	72 °C	1

3.2.5.3. Visualización y determinación de tamaño de los productos de amplificación. Para comprobar la presencia de amplicones de cada aislamiento, el DNA obtenido en la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR Green, y utilizando el marcador de peso molecular GeneRuler™ de 100bp Thermo Scientific. Se reveló en fotodocumentador (ENDURO™ GDS Gel Documentation System) para determinar el peso y tamaño de los amplicones.

3.2.5.4. Determinación de la especie. Los amplicones obtenidos se enviaron al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia para su respectiva secuenciación, la lectura de dicha secuencia se hizo con el software 4Peaks, el cual está ligado con la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar cada amplicón o secuencia problema (Query sequence) de nucleótidos en donde se analiza y comparan las secuencias de nucleótidos con secuencias en la base de datos y se calcula la significancia estadística.

3.2.5.5. Análisis de las secuencias. Las secuencias de nucleótidos obtenidos de las 10 cepas fúngicas provenientes de las muestras de suelos recolectadas en los cultivos de berenjena, se visualizaron con el programa 4Speak

(<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>). Cada secuencia se introdujo en la base de datos pública GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se compararon con otras secuencias depositadas (búsqueda BLAST) (Altschul *et al.*, 1997; Bou *et al.*, 2011). Finalmente, se construye un árbol filogenético a través del programa BLAST del NCBI y se refleja de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre las especies fúngicas comparadas.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Caracterización macroscópica de cepas nativas. La Tabla 3.2 indica la morfología de la colonia y sus características macroscópicas, como el diámetro de micelios de 10 aislados de *Trichoderma*. De igual forma la Figura 3.1 muestra el registro fotográfico representativo de cada uno de los aislamientos. Las colonias de *Trichoderma* puras cultivadas en las placas de PDA a temperatura controlada mostraron patrones de crecimiento y características diferentes. El color de las colonias varió de blanco verdoso a verde oscuro. Morfológicamente, la formación de anillos concéntricos dentro del medio de crecimiento también se adoptó como parámetro de caracterización entre las cepas. Los aislados T002, T004, T005, T008 y T0010 (todos procedentes del municipio de Cereté), mostraron ausencia de anillos, mientras que las cepas T007, T006 y T003 cada una procedente del municipio de Tierralta, San Pelayo y Cereté respectivamente, presentaron entre 1 y 4 anillos. Por su parte, se observó que los aislamientos T001 y T009 mostraron ausencia de anillos, pero presencia de pústulas de color amarillo (Figura 3.1).

Muchas especies de *Trichoderma* se caracterizan por un rápido crecimiento de sus colonias, en caja de Petri con Papa Dextrosa Agar, pueden alcanzar un diámetro de 7 a 9 cm en 72 h (Stocco, 2014). En este experimento, el diámetro medio de la colonia alcanzó los 9 cm a las 96 horas después de la siembra en cámara húmeda. Al comienzo de su crecimiento, generan abundante micelio aéreo de color blanco grisáceo, luego su color cambia al verde oscuro, por la gran masa de conidios que se generan. En muchas colonias los conidios son primero de color amarillos, llegando a ser de color amarillo-verdoso al madurar. Estas observaciones coinciden con las reportadas por Stocco (2014).

De acuerdo a Kannangara et al. (2017) y Samuels (2006), el uso de características morfológicas es uno de los métodos convencionales para identificar especies de *Trichoderma* y permanece como un método potencial para identificar estos hongos hasta el nivel de género. Sin embargo, según Martínez et al. (2015) y Druzhinina et al. (2006), a pesar que aún se utilizan aspectos morfológicos para la ubicación taxonómica de las especies, pero estos resultan insuficientes, por lo que se recurre a herramientas moleculares, los cuales contribuyen a la identificación específica y certera.

Cada aislado de *Trichoderma* que tenga una morfología de colonia similar, puede pertenecer, muy probablemente, a la misma especie (Kannangara et al. 2017), pero las características de las colonias no son suficientes para identificarlas hasta dicho nivel taxonómico (Atanasova et al., 2013; Samuels, 2006).

Tabla 3.2. Caracterización macroscópica de diez aislamientos de *Trichoderma* spp. provenientes de suelos cultivados con berenjena en el departamento de Córdoba, Colombia.

Número de aislamiento	Color del micelio	Colonia en PDA	Diámetro medio de la colonia (cm)			
			24h	48h	72h	96h
T002	Blanco verdoso - verde amarillento	Anillos ausentes	3,0	6,8	8,0	9,0
T003	Verde oscuro-Blanco	1 anillo por plato	3,2	7,0	8,0	9,0
T004	Verde oscuro - blanco verdoso	Anillos ausentes	3,2	6,8	8,0	9,0
T005	Verde oscuro - blanco verdoso	Anillos ausentes	3,4	7,0	8,8	9,0
T008	Verde oscuro -blanco verdoso	Anillos ausentes	3,4	7,0	8,7	9,0
T0010	Verde oscuro - blanco verdoso – Blanco	Anillos ausentes	3,3	7,0	8,0	9,0
T001	Verde oscuro - verde amarillento – Blanco	Pústulas amarillas	3,0	6,8	8,5	9,0
T007	Verde oscuro - blanco verdoso	3 anillos por plato	3,4	7,0	8,8	9,0
T006	Verde oscuro - blanco verdoso	3-4 anillos por plato	3,2	6,9	7,9	9,0
T009	Verde oscuro - verde amarillento – blanco	Pústulas amarillas	3,2	7,5	7,9	9,0

Figura 3.1. Apreciación macroscópica de 10 aislamientos de *Trichoderma* spp. en medio PDA provenientes de suelos cultivados con Berenjena. A) T002; B) T003; C) T004; D) T005; E) T0010 y F) T008.

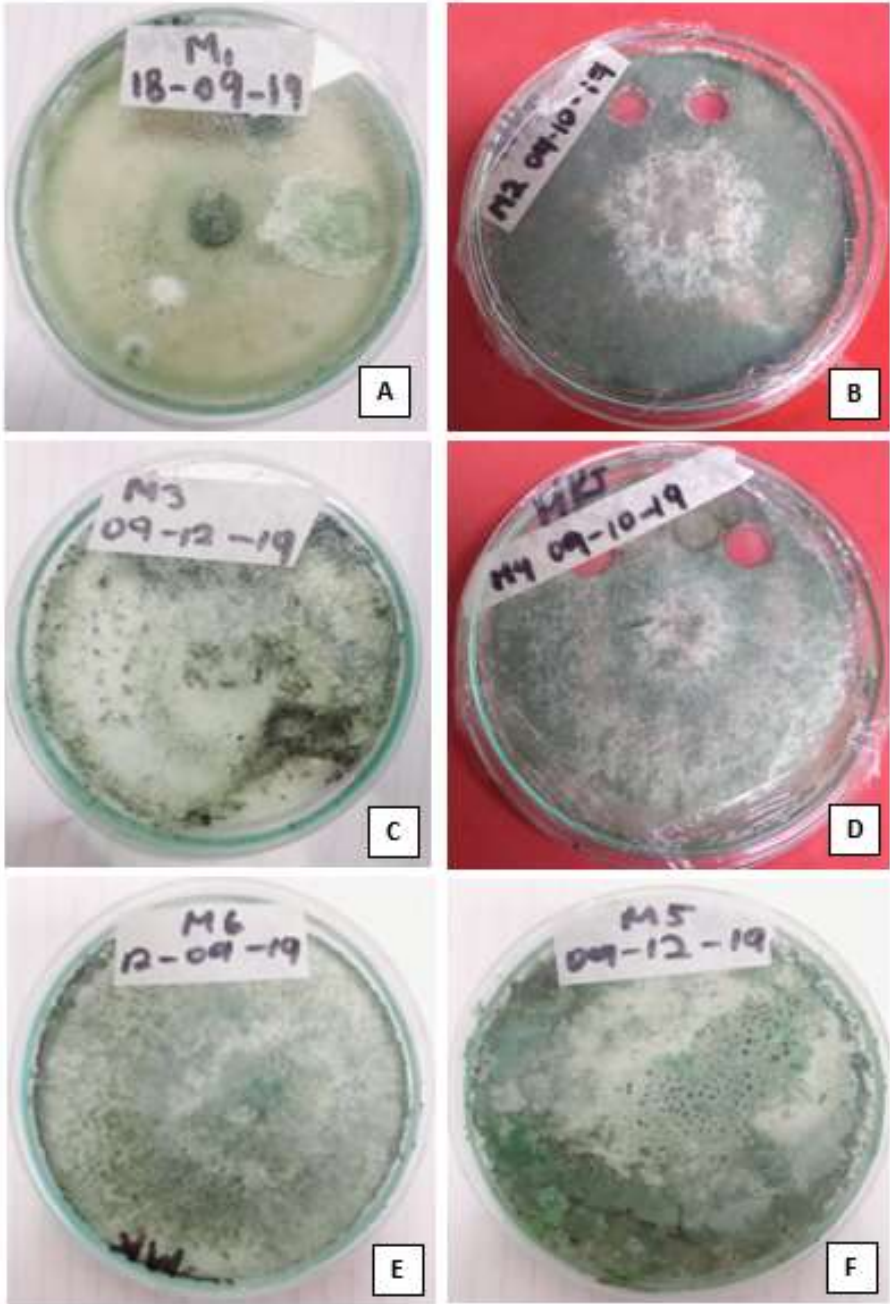
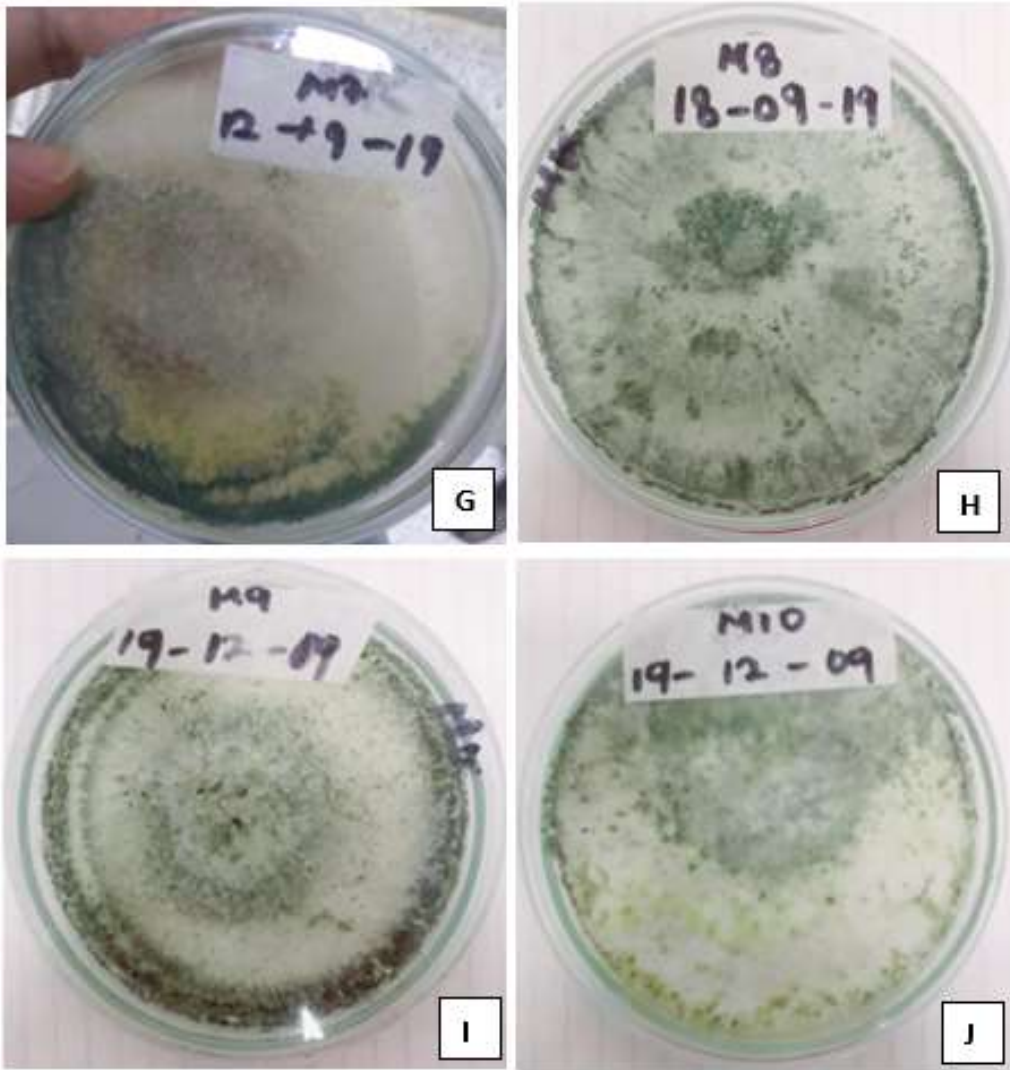


Figura 3.2. Continuación: Apreciación macroscópica de 10 aislamientos de *Trichoderma* spp. en medio PDA provenientes de suelos cultivados con Berenjena. G) T001; H) T007; I) T006 y J) T009.



3.3.2 Caracterización molecular de cepas.

3.3.2.1. Visualización y determinación del tamaño de los amplicones. En el gel de agarosa (Figura 3.3) se observan las bandas de 10 aislados de *Trichoderma*. Ocho de los diez amplicones (T001, T002, T005, T006, T007, T008, T009 y T0010) se visualizaron con mayor definición y color, de los cuales podemos inferir que se amplificaron correctamente, son de buena calidad y se pueden usar en el análisis de las secuencias. Por el contrario, las bandas T003 y T004 carecen de color en la visualización, efecto asociado posiblemente a la deficiencia en las cantidades de ADN, necesarias para la amplificación.

La amplificación de los productos de PCR de la región 16S del ADNr con los primers ITS3 e ITS4 generaron fragmentos de aproximadamente 400 pb, lo cual concuerda con los trabajos realizados por Stocco (2014), quien analizando molecularmente 37 cepas de *Trichoderma*, encontró que en todas las corridas analizadas se determinaron productos de amplificación con una longitud de fragmentos que variaron desde 200 pb hasta 3000 pb. Resultados similares fueron reportados por Asis y Siddiquee (2016), quienes amplificaron con éxito un fragmento específico del tamaño esperado de aproximadamente 600 pb y 400 pb a partir del ADN de todos los aislados de *Trichoderma* investigados, tanto para las regiones ITS como para las regiones TEF1, respectivamente.

3.3.2.2. Análisis de secuencias génicas e identificación de cepas. Una vez realizada la secuenciación a partir de la amplificación de la región espaciadora de transcrito interno (ITS) del ADN de cada cepa con la ayuda de los primer ITS3 (5` - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`) e ITS4 (5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3`) descritos por White et al. (1990), se exportaron las secuencias problemas (*Query sequences*) de proteínas o nucleótidos con el uso del programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y estas se compararon con todas las secuencias contenidas en la base de datos del NCBI (GenBank) con el fin de encontrar similitudes u homologías de nuestras secuencias problemas con otras secuencias ya registradas. Un valor de similitud aproximado al 100% indicaría que era una secuencia conocida con anterioridad.

El análisis de secuencias de nucleótidos (Tabla 3.3.), reveló que todos los microorganismos presentan una identificación por encima del 97% y un E valor cercano a 0.0 (Tabla 3.3), por lo que la aceptación y la confiabilidad de la comparación entre las secuencias es alta.

- La alineación de secuencias reveló similitudes con una homología del 99% entre M1 (Th001) y la cepa PPRI 16173 de *Trichoderma lixii*.
- La secuencia de la cepa M2 (Th003) en la región ITS nos muestra homología del 97% con el aislado SDAS203498 del género fúngico *Trichoderma* sp.
- La cepa M5 (Th008) en el gen ITS fue encontrada por el BLAST similar en un 98% con la especie *Trichoderma virens* del género fúngico *Trichoderma*.

- La secuencia ITS de la cepa M6 (Th0010) corrobora que pertenece al género *Trichoderma* y presenta homología del 99 % con el aislado SDAS203498.
- Para gen ITS del aislamiento M7 (Th001) se encontró homología del 97% de identidad con la especie *Trichoderma asperellum*.
- Se logró identificar homología en la especie *Trichoderma asperellum* en el aislamiento M8 (Th007) con un porcentaje de identidad del 98%.
- El aislamiento M9 (Th006) en la región ITS fue similar con el aislado SDAS203498 en un 99% de identidad en el género fúngico *Trichoderma*.
- Para el caso del aislamiento M10 (Th009) se obtuvo un 97% en identidad con similitud con *Trichoderma asperellum*.

Figura 3.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR Green de los amplicones del gen ITS de diez aislamientos de *Trichoderma* spp.

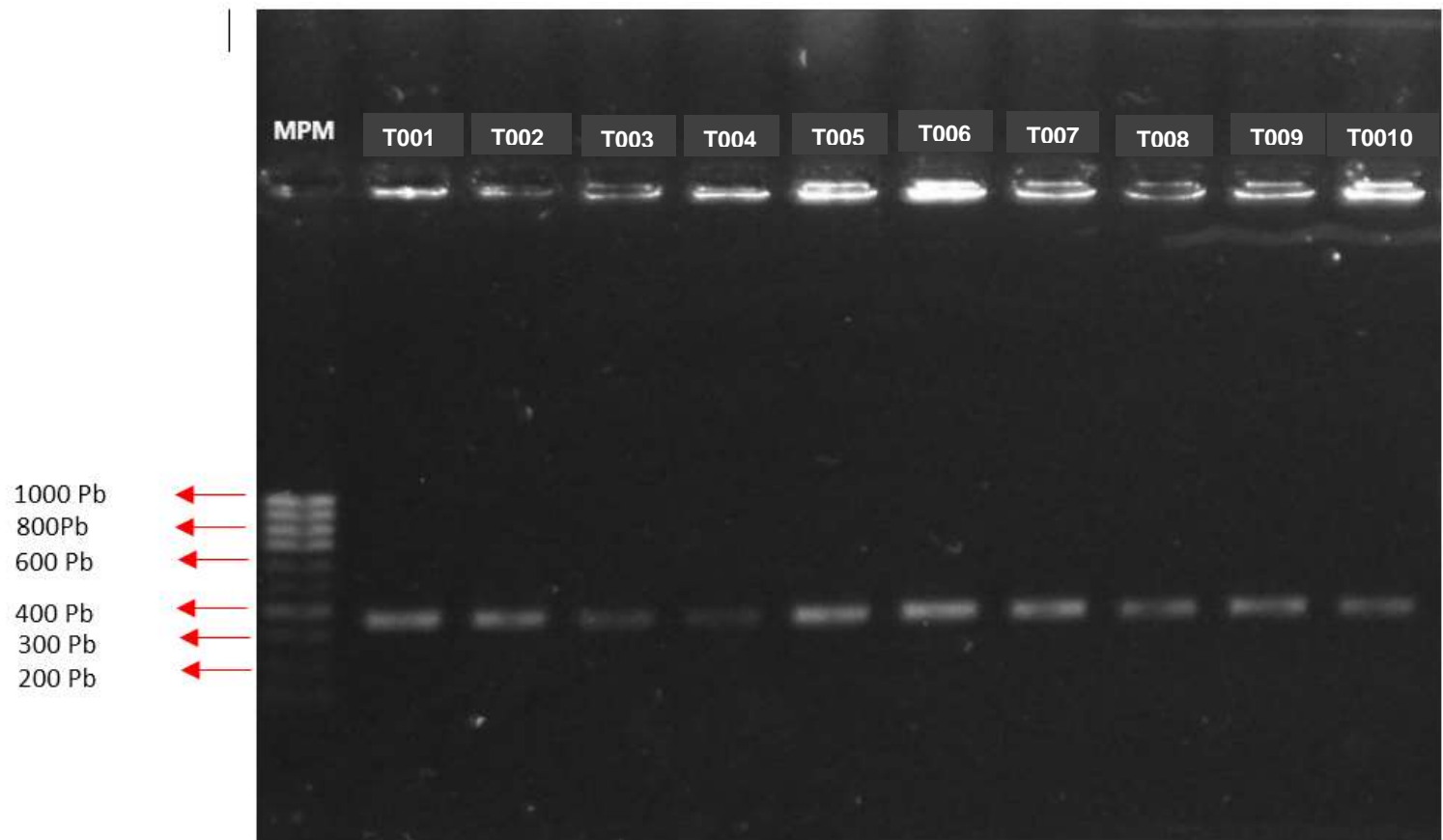


Tabla 3.3. Secuenciación de las regiones ITS3, ITS4 y del gen 5.8S del ADNr de 8 aislamientos de *Trichoderma* spp. y la búsqueda BLAST.

Código	Descripción	E. valor	Identificación (%)	Localización del aislamiento
(T001)	<i>Trichoderma lixii</i> strain PPRI 16173 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; ITS 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ITS 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence (Jacobs, 2019.).	0,0	99%	Tierralta (Córdoba) 8°15'07" N / 76°03'03.2" O
(T002)	<i>Trichoderma</i> sp. isolate SDAS203498 ITS 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and ITS 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. (Zhou, 2019).	0,0	97%	Cereté (Córdoba) 08°57'33,4" N/75°61'14,7" O
(T005)	<i>Trichoderma virens</i> isolate V7 ITS 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and ITS 2, partial sequence, (Devi et al.,2013.).	0,0	98%	Cereté (Córdoba) 08°51'39" N/ 75°49'40,5" O
(T006)	<i>Trichoderma</i> sp. isolate SDAS203498 ITS 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and ITS 2, complete sequence; and large subunit	0,0	99%	San Pelayo 08°49'48" N/ 75°45'57" O

	ribosomal RNA gene, partial sequence (Zhou, 2019).			
(T007)	<i>Trichoderma asperellum</i> isolate TV190 ITS 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and ITS 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. (Pavone y Dorta, 2015).	0,0	98%	Tierralta (Córdoba) 8°10'22"N 76°03'34"O
(T008)	<i>Trichoderma asperellum</i> isolate TV190 ITS 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and ITS 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. (Pavone y Dorta, 2015).	0,0	98%	Cereté (Córdoba) 8° 51' 27" N / 75° 48' 52" O
(T009)	<i>Trichoderma</i> sp. isolate SDAS203498 ITS 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and ITS 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (Zhou, 2019).	0,0	99%	San Pelayo 08°45'23" N/ 75°52'35" O
(T0010)	<i>Trichoderma asperellum</i> strain T63 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; ITS 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ITS 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence (Ma'Ruf y Mohd Zainuddin, 2015).	0,0	97%	Cereté 08°45'23,6" N/ 75°52'36" O

3.3.2.3. Árbol filogenético y construcción del dendograma. Luego de la secuenciación a partir de la amplificación del gen 5.8S del ADNr con el uso de los primers ITS3 e ITS4, se eligió la base de datos Genbank y el programa BLAST del NCBI para obtener la distancia entre los resultados comparados. Finalmente se construyó el dendograma (Figura 3.4), observando de forma esquemática, el grado de disimilaridad genético entre los aislamientos fúngicos comparados. A partir de las secuenciaciones observadas en BLAST, se identificaron especies homologas a nuestros aislamientos, con el fin de tomarlos como controles en el árbol filogenético (Tabla 3.4), éstas se corrieron conjunto a nuestras secuencias:

Los resultados obtenidos muestran que todos los aislamientos forman cuatro grupos de similaridad (I, II, III y IV), en donde los aislamientos con mayores diferencias genéticas o con mayor diversidad se encuentran más alejados y a su vez lo que son similares o con mayor proximidad se reúnen en un grupo más cercano.

El **grupo I** estuvo conformado por la especie testigo *Trichoderma lixii* cepa CBS 126411 siendo este homólogo a la cepa T001 (*Trichoderma lixi*) y con menor proximidad, pero en el mismo grupo, a T005 (*Trichoderma virens* aislado V7). *T. lixii* se reportó por Katoch et al. (2019), como una especie con propiedades antifúngicas, debido a que produce péptidos de cadena larga y media, en específico uno llamado Tribacopin AV al que se le atribuye esta propiedad y *Trichoderma virens* el cual según Whipps y Budge (1990) al ser este abundante y estar activo en la filósfera de la planta fue uno de los microorganismos que mejor logró suprimir al hongo *S. sclerotiorum*, ya que ataca los sclerocios y logra crecer dentro de las hifas del hésped hasta llegar al tegido de la planta.

En el **grupo II** tenemos la cepa C7 *Trichoderma asperellum*, más distante genéticamente a las otras cepas, pero guardando similitudes con los controles C2 *Trichoderma virens* y C3 *Trichoderma asperellum* los cuales forman un solo parámetro genético. Cruz-Triana et al. (2017), lograron evidenciar el poder de la cepa *T. asperellum* como inhibidor y antagonista de especies patógenas como *Fusarium* sp. *in vitro* y en campo de *Fusarium* sp., *C. kikuchii* y *P. pachyrhizi*, de igual forma reportaron un aumento en la estimulación del crecimiento vegetal y el incremento del número de vainas por planta en soya. Esta especie también está reportada en los grupos tres y cuatro.

El **grupo III** está conformado por el aislado T0010 de *Trichoderma asperellum*, obtenido de suelo rizosférico procedente del municipio de Cereté, el cual respectivamente tiene homología y baja disimilaridad con una cepa de la misma especie, el aislado UGM-LHAF de *Trichoderma asperellum*.

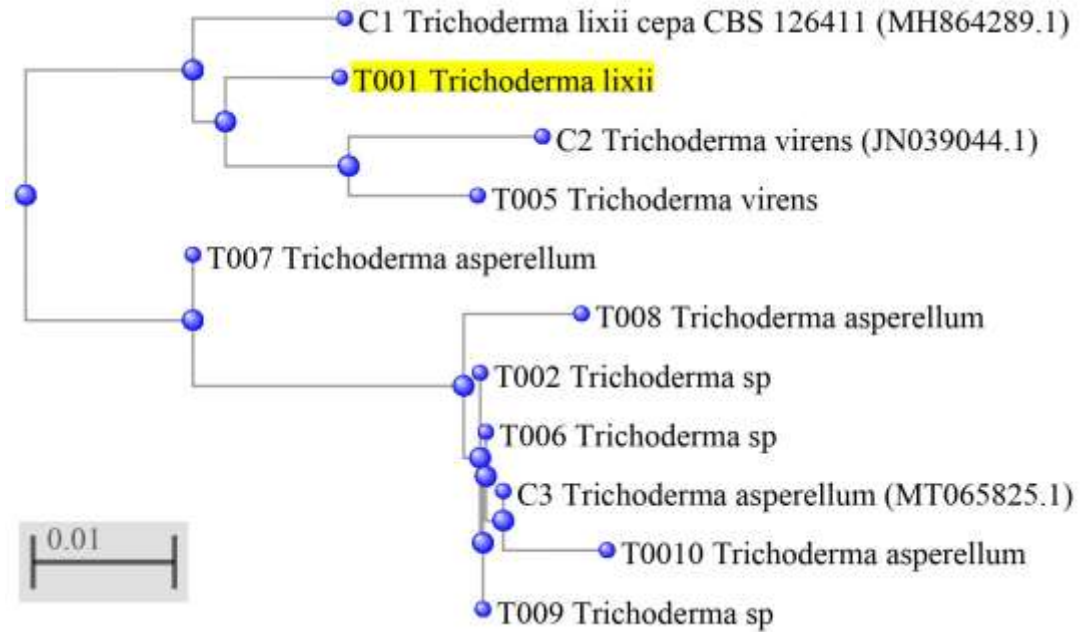
El **grupo IV** está conformado por los aislados mayormente homólogos T009 (*Trichoderma* sp. isolate SDAS203498), T002 (*Trichoderma* sp. isolate SDAS203498) y T006 (*Trichoderma* sp. isolate SDAS203498), estas presentaron bajo grado de disimilaridad por lo que son muy parecidas entre ellas. La cepa T0010

(*Trichoderma asperellum*), también integra este grupo pero con un menor grado de similitud,

Tabla 3.4. Caracterización de cepas de *Trichoderma* usadas como controles para la construcción del árbol filogenético de ocho asilamientos.

Código del testigo	Descripción molecular	Origen
C1 <i>Trichoderma lixii</i> cepa CBS 126411	<i>Trichoderma lixii</i> strain CBS 126411 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Uppsala (Países bajos)
C2 <i>Trichoderma virens</i>	<i>Trichoderma virens</i> isolate maize 9-B microsatellite AG22 sequence	Bernburg (Alemania)
C3 <i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i> strain CGMCC 6422 RNA polymerase subunit II (RPB2) gene, partial cds	Zhejiang (China)

Figura 3.4. Dendograma de aislamientos de *Trichoderma* spp. obtenidos de sistemas productivos de berenjena en el departamento de Córdoba, Colombia.



3.4. CONCLUSIONES

Un total de diez aislados de *Trichoderma* se identificaron de forma preliminar mediante observación morfológica, ocho de ellos lograron identificarse molecularmente.

La identificación basada en secuencias de ITS demostró que tres de las ocho de las cepas analizadas corresponden a *T. asperellum*, una de ellas a *T. lixii* y otra a *T. virens*.

Se logró evidenciar similitudes genéticas en las cepas de *Trichoderma* encontradas en el departamento de Córdoba, con cepas halladas en Países bajos, Alemania y China, reflejando de esta manera una alta diversidad genética.

3.5. LITERATURA CITADA

- Kannangara, S., Dharmarathna, R. M. G. C. S. y Jayarathna, D. L. (2017). Isolation, identification and characterization of *Trichoderma* species as a potential biocontrol agent against *Ceratocystis paradoxa*. *Journal of Agricultural Sciences–Sri Lanka*, 12(1). 51-62. <http://dx.doi.org/10.4038/jas.v12i1.8206>
- Martínez, B., Infante, D. y Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30(1). 11-22.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G. y Kubicek, C. P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47(2), 55. <https://doi.org/10.1007/s10267-006-0279-7>
- Atanasova, L., Druzhinina, I. S., Jaklitsch, W. M., Mukherjee, P., Horwitz, B. y Singh, U. (2013). Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. *Trichoderma: biology and applications*. CABI, Wallingford, 10-42.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195-206.
- Zhou, Y. (2019). Large-scale *Trichoderma* diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK871221.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=45NUCZCK016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK871221.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=45NUCZCK016)
- Jacobs, A. (2019). DNA Barcoding of the South African National Collection of Fungi. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY263588.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=45N4Z12N016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY263588.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=45N4Z12N016)
- Devi, P., Prabhakaran, N., Kamil, D., Pandey, P. and Borah, J., L.(2013). Characterization of Indian native isolates of *Trichoderma* spp. And assessment of their bio-control efficiency against plant pathogen. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JN039040.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=2&RID=45P3A4ZC014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JN039040.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=2&RID=45P3A4ZC014)
- Zhou, Y. (2019). Large-scale *Trichoderma* diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location. Recuperado en [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK871221.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=45P7C82K01R](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK871221.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=45P7C82K01R)
- Pavone, D, F. and Dorta, B. (2015). Diversity of the fungus *Trichoderma* spp on corn fields in Venezuela. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP263665.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=45PHKBXG014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP263665.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=45PHKBXG014)
- Pavone, D, F. and Dorta, B. (2015). Diversity of the fungus *Trichoderma* spp on corn fields in Venezuela. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP263665.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=45PHKBXG014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP263665.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=45PHKBXG014)

- Zhou, Y. (2019). Large-scale Trichoderma diversity was associated with ecosystem, climate and geographic location. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK871221.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=45NUCZCK016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK871221.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=45NUCZCK016)
- Ma'Ruf, N, A. and Mohd Zainuddion, N, A, I, (2015). Molecular Characterization of Endophytic Fungi Isolated from Eurycoma longifolia Jack and Malay Traditional Vegetables. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KT358890.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=45PPT2XC014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KT358890.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=45PPT2XC014)

CAPÍTULO IV

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTAGÓNICO *In-vitro* DE
Trichoderma spp. CONTRA *Sclerotium* sp.**

RESUMEN

El cultivo de berenjena es de gran importancia en Córdoba, donde se siembran 140 ha, por lo cual contribuye con 1/3 a la producción nacional. Sin embargo, este cultivo es afectado por el hongo *Sclerotium* spp., el cual afecta todos los estados de desarrollo de la planta. Adicionalmente, la nutrición del cultivo depende exclusivamente del uso de fertilizantes de síntesis química, que tienen impactos negativos en el medio ambiente. *Trichoderma* spp. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial biocontrolador *In vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium* sp. y la capacidad promotora de crecimiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en plántulas de berenjena en condiciones de casa malla. Se realizaron tres experimentos: el primero consistió en la evaluación de la capacidad antagonista *in vitro* de diez aislamientos de *Trichoderma* spp. (tratamientos) obtenidos de suelo rizosférico de cultivos comerciales de *S. melongena* en el Valle medio del Sinú, para ello se estimó el porcentaje de crecimiento radial de *Trichoderma* spp. frente a *Sclerotium* sp. En el segundo experimento se evaluó los efectos de las diez cepas sobre el porcentaje de germinación de semillas de berenjena, las cuales se embebieron en soluciones de 1×10^8 esporas. mL⁻¹ de agua. En el tercer experimento se evaluaron las variables de crecimiento: Masa seca de tallo (MST), masa seca de raíz (MSR), masa seca total (MT), altura de planta (AP) longitud de raíz (LRAÍZ), número de hojas (NH) y número de nudos (NN). Los resultados evidenciaron diferencias estadísticamente significativas al 1% y 5% para el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) al día uno, dos y tres de observación; así mismo, para el porcentaje de germinación ($Pr \leq 0,01$) y cinco de las siete variables del crecimiento, a saber, masa seca de tallo, masa seca de raíz, masa seca total, altura de planta y longitud de raíz. Estos resultados permiten inferir que las cepas: *Trichoderma lixii* (T001), *Trichoderma* sp. (T003) y *Trichoderma asperellum* (T008) podrán utilizarse como alternativa al uso de productos químicos para el control de *Sclerotium* spp., y el uso de fertilizantes químicos en el cultivo de berenjena en Córdoba.

Palabras claves: Cultivo dual, porcentaje de germinación, crecimiento radicular.

ABSTRACT

The cultivation of eggplant is of great importance in Córdoba, where 140 ha are planted, thus contributing 1/3 to the national production. However, this crop is affected by the fungus *Sclerotium* spp., which affects all stages of development of the plant. Additionally, crop nutrition depends exclusively on the use of chemically synthesized fertilizers, which have negative impacts on the environment. *Trichoderma* spp. The objective of this work was to evaluate the In-vitro biocontroller potential of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium* sp. and the growth-promoting capacity of native strains of *Trichoderma* spp. in eggplant seedlings in mesh house conditions. Three experiments were carried out: the first consisted in the evaluation of the antagonistic capacity in vitro of ten isolates of *Trichoderma* spp. (treatments) obtained from rhizospheric soil of commercial crops of *S. melongena* in the middle Sinú Valley, for this the percentage of radial growth of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium* sp. In the second experiment, the effects of the ten strains on the germination percentage of eggplant seeds were evaluated, which were soaked in solutions of 1×10^8 spores. mL⁻¹ of water. In the third experiment, the growth variables were evaluated: stem dry mass (SDM), root dry mass (RDM), total dry mass (TM), plant height (PH) root length (LROOT), number of leaves (NL) and number of nodes (NN). Our results showed statistically significant differences at 1% and 5% for the percentage inhibition of radial growth (PICR) at day one, two and three of observation; Likewise, for the germination percentage ($Pr \leq 0.01$) and five of the seven growth variables: Stem dry mass, root dry mass, total dry mass, plant height and root length. These results allow us to infer that the *Trichoderma lixii* (T001), *Trichoderma* sp. (T003) and *Trichoderma asperellum* (T008) may be used as an alternative to the use of chemical products for the control of *Sclerotium* spp., And the use of chemical fertilizers in the cultivation of eggplant in Córdoba.

Key words: Dual culture, germination percentage, root growth.

4.1. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Sclerotium* son hongos fitopatógenos habitantes del suelo, este hongo causa podredumbre de raíz y cuello, en la literatura la enfermedad se le denomina de diferentes formas: pudrición basal de tallo y raíz, mal de esclerocio, atacan un amplio rango de hospedante, alrededor de 500 hospedadores (Prova et al. 2018, Nahar et al., 2020; Islam et al. 2020); este representan estructuras de resistencia la cual se encuentra constituidas por esclerocios que pueden permanecer viables en el suelo hasta 10 años y pueden escapar con facilidad de la acción de los fungicidas de origen sintético (Adams, 1990; Hoyos-Carvajal et al., 2008).

Sclerotium rolfsii (teleomorfo: *Athelia rolfsii*) y otras siete especies de *Sclerotium*, atacan principalmente los tallos del huésped, los primeros signos de infección, son lesiones de color marrón oscuro en el tallo en o justo debajo del nivel del suelo; el amarillamiento progresivo y la marchitez de las hojas. Después de esto, el hongo produce abundante micelio blanco y esponjoso en los tejidos infectados y en el suelo. Los esclerocios de tamaño relativamente uniforme se producen en el micelio, redondeados y blancos cuando son inmaduros y luego se vuelven de color marrón oscuro a negro (Mullen, 2001; Xu et al., 2010).

El hongo ocasionalmente produce basidiosporas (la etapa sexual de la reproducción) en los márgenes de las lesiones y en condiciones húmedas, aunque esta forma no es común, las plántulas son muy susceptibles y mueren rápidamente una vez que se infectan. Las plantas más viejas que han formado tejido leñoso son gradualmente rodeadas por lesiones y finalmente mueren, los tejidos invadidos son de color marrón pálido y suave, pero no acuosos (Mullen, 2001).

Este fitopatógeno es común en diversos agroecosistemas, en tanto el cultivo de berenjena no es ajeno a la afectación de *Sclerotium* spp. en plantas jóvenes y en producción (Sanoval et al., 2014). El cultivo es importante para las familias campesinas en el departamento de Córdoba, las cuales contribuyeron significativamente a la producción de 3.254 toneladas de fruto cosechados para el 2018 (Agronet 2020; FAO, 2020).

Aunque son varias las enfermedades que afectan el cultivo de Berenjena, para la zona del Valle Medio del Sinú, los efectos de *Sclerotium* son de especial atención, dado a la común sintomatología de pudriciones basales asociadas a *Sclerotium* durante los últimos años, lo cual disminuye la densidad de población y consigo los rendimientos decrecen proporcionalmente (Iwuagwu et al., 2019).

Desde hace ya una década, la adopción de tecnologías para el cultivo de Berenjena ha permitido el aumento ligero de la productividad promedio nacional, el cual es de 3.473 toneladas, el área cosechada es de 346 ha y los rendimientos de 10,63 ton/ha. Para el departamento de Córdoba, el área sembrada es de 140 ha, la producción

es de 1.056 ton y los rendimientos de 7,17 ton/ha, lo cual lo ubican por debajo del promedio nacional (). De acuerdo con Aramendiz et al. (2010), la berenjena es cultivada, generalmente, en áreas no mayores a los 2.500 m², pues constituye un cultivo tradicional en la agricultura familiar y en los cultivos de pancoger; de manera que es poco, o nada, el manejo de *Sclerotium* dentro de las plantaciones.

El manejo de las enfermedades del cultivo, y en especial las pudriciones basales por *Sclerotium*, requieren de especial para los cultivos en el departamento de Córdoba, el cual contribuye significativamente a la producción nacional. Datos recientes indican que para el 2018, el 31,98% del área sembrada y el 28,41% de la producción nacional estuvo a favor del departamento, en el cual, desde 2016, la producción ha disminuido debido a factores aún no discutidos. Un manejo adecuado y oportuno de las enfermedades, mediante controladores biológicos, podría asegurar plantaciones más resistentes a eventos abióticos y bióticos alternos (Rejeb et al., 2014).

Usualmente, el monitoreo y control de *Sclerotium* se realiza mediante el uso de fungicidas de origen sintético, sin embargo, dicho control es difícil debido a que solo se atacan los esclerocios remanentes en el suelo y se debe mantener la acción tóxica en el tiempo (Hoyos-Carvajal et al., 2008). De modo que, el control biológico tiene mayor aceptación debido a que se reduce la deposición de contaminantes al medio ecológico, es un método que perdura en el tiempo y es relativamente económico (Bautista et al., 2007; Nahar et al., 2020).

El manejo inadecuado y monótono de las enfermedades ha priorizado el uso de enemigos naturales para el control de los fitopatógenos, una actividad esencial en la implementación de las buenas prácticas del cultivo y el uso sostenible de los recursos (Köhl, 2006). En un reciente estudio llevado a cabo por Siddique et al. (2018), se aplicó la cepa *T. harzianum* para el control de la pudrición en Berenjena en condiciones de campo, se encontró que el tratamiento tuvo efectividad sobre el control de la enfermedad, con porcentajes incidencia y severidad de 38,43% y 3,60% respectivamente, con respecto al control (sin aplicación de químicos ni bio-agentes) para los mismos parámetros 62,50% y 6,36% respectivamente.

El género *Trichoderma*, (teleomorfo *Hypocrea-Ascomycetes: Hypocreales*) agrupa más de 100 especies en su mayoría asociadas a estados telomórficos en el género *Hypocrea* (Druzhinina et al. 2006). Las especies del género *Trichoderma* son cosmopolitas y componentes prevalentes de diferentes ecosistemas en una amplia gama de ambientes y se caracterizan por incluir individuos de crecimiento rápido y capacidad para asimilar una diversa gama de sustratos, preferencialmente en material en descomposición en el suelo, en donde se halla una porción significativa de la biomasa total de hongos (Hoyos-Carvajal, 2012; Kredics et al. 2014). La presencia de especies de *Trichoderma* es modulada por varios factores como el microclima, la disponibilidad de sustratos, así como las interacciones ecológicas complejas (Kubicek et al. 2008; Hoyos-Carvajal y Bissett, 2012; Kredics et al. 2014).

Sin embargo, algunas especies son omnipresentes, mientras que otras están limitados a áreas geográficas específicas (Harman et al. 2004).

Trichoderma es un género de hongos con variados atributos biológicos que lo hacen apto como agente de control biológico y por ello es ampliamente usado para control de fitopatógenos a escala industrial o artesanal, no obstante las generalizaciones sobre el potencial y modo de acción de *Trichoderma* sobre patógenos han desvirtuado su uso exitoso en agricultura, sencillamente porque los caracteres deseables para controlar patógenos se restringen a aislamientos de especies, no a especies de *Trichoderma* o más aún, todas las especies de este género (Hoyos-Carvajal y Bissett, 2012). Por tanto, es un error concluir actividad biológica de este hongo partiendo de estudios no adaptados al medio ni realizados con los aislamientos debidamente formulados o escalados, lo cual puede cambiar su comportamiento y actividad enzimática por silenciamiento o represión de genes en sustratos usados para su producción masiva (Hoyos-Carvajal, 2012). Por tal razón buscamos evaluar el potencial biocontrolador *In vitro* de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium* sp, de igual forma valorar la capacidad que tiene el hongo *Trichoderma* spp, para promover el crecimiento en plántulas de berenjena en condiciones de casa malla.

4.2. MATERIALES Y METODOS

4.2.1. Localización. El estudio de campo y laboratorio se realizó durante el segundo semestre de 2019, en el área experimental de la Universidad de Córdoba (municipio de Montería), ubicada a los 8° 48" latitud N y 75°52" longitud O con una elevación de 15 m.s.n.m. El área de entorno de la zona presenta una precipitación media anual de 1200 mm, temperatura promedio de 28°C, brillo solar de 1800 horas luz/año y una humedad relativa del 84% (Palencia et al. 2006).

4.2.2. Material biológico. Se emplearon diez aislamientos hongos como antagonistas potenciales, previamente identificados: *Trichoderma lixii* (T001), *Trichoderma* spp. (T002), *Trichoderma* spp. (T003), *Trichoderma* spp. (T004), *Trichoderma virens* (T005), *Trichoderma* sp. (T006), *Trichoderma asperellum* (T007), *Trichoderma asperellum* (T008), *Trichoderma* sp. (T009), *Trichoderma asperellum* (T0010), los cuales fueron recolectados de lotes comerciales de cultivos de berenjenas presentes en el departamento de Córdoba.

Sclerotium spp. fue aislado a partir de esclerocios presentes en tejidos de plantas de Berenjenas afectadas por este, en lotes de cultivos comerciales en el departamento de Córdoba.

4.2.3. Ensayos de antagonismo *in vitro* (cultivos duales). Se evaluaron los mecanismos de acción antagónica de las distintas cepas de *Trichoderma* frente *Sclerotium*, utilizando la técnica de Bell et al. (1982). En cajas de Petri (9 cm de diámetro) con el medio Papa Dextrosa Agar, se colocaron en extremos opuestos de cada caja, discos de PDA de 1 cm de diámetro con crecimientos puros de *Sclerotium* spp. o de *Trichoderma* spp. Cada cepa de *Trichoderma* spp., constituyó un tratamiento, con seis repeticiones por tratamiento. Adicionalmente, discos de PDA o *Trichoderma* spp., fueron sembrados en cajas de PDA, los cuales fueron usados como controles. El experimento se repitió tres veces, durante 3 días y los datos fueron tomados cada 24 horas, utilizando un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA).

4.2.3.1. Evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. frente a *Sclerotium* sp. La evaluación se realizó mediante la observación de los mecanismos de competencia, mico-parasitismo y antibiosis de acuerdo con la escala descrita por Bell et al. (1982) (Tabla 4.1), se midieron los radios de crecimiento del patógeno (RCP) y de los antagonistas (RCA) con la ayuda de una regla graduada. Conjuntamente, se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula de Ezziyyani et al. (2004), $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento.

Tabla 4.1. Capacidad antagónica de *Trichoderma* según la escala de Bell et al. (1982).

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión del antagonista sobre la colonia de <i>Sclerotium</i> sp.
1	Invasión del 25% de la colonia del hongo <i>Sclerotium</i> sp.
2	Invasión del 50% de la colonia hongo <i>Sclerotium</i> sp.
3	Invasión de 100% de la colonia del hongo <i>Sclerotium</i> sp.
4	Invasión de 100% de la colonia del hongo <i>Sclerotium</i> sp., esporulando sobre ella.

4.2.4. Evaluación de *Trichoderma* spp. sobre la germinación de semillas Para los ensayos de geminación, se realizaron dos fases: Primero, se preparó una solución de 10^8 conidias, para lo cual tomamos una muestra de cada cepa purificada en medios de cultivo de Agar al 1 %. Las esporas del hongo fueron removidas con agua destilada estéril y colectadas en tubos de ensayo de 25ml. De cada solución, se tomó un mL, que se depositó en un tubo ependorff, el cual fue agitado en un vortex durante 30 segundos. De cada tubo se tomaron alíquotas de $100\mu\text{m}$ y con la ayuda de una cámara de Neubauer, se determinó su concentración a 40x usando microscopio de luz. El procedimiento se repitió tres veces. Las concentraciones de cada aislamiento se llevaron a 1×10^8 esporas. mL^{-1} de agua.

En cada una de las 10 soluciones, se embebieron 100 semillas de berenjena (C-015) durante 3 minutos, donde fueron manualmente agitadas. Posteriormente, la solución fue decantada, las semillas fueron secadas a temperatura ambiente y colocadas equidistantes sobre papel absorbente, humedecido de agua, sobre la superficie de un plato de icopor (poliestireno expandido de 2.2cm de alto y 26cm). En cada plato, se colocaron 100 semillas, las cuales fueron cubiertos con otro plato del mismo material y dimensiones. Cien semillas, de la misma variedad, sin ningún tipo de inoculación, fueron utilizadas como control. Se realizaron tres repeticiones por aislamiento y el experimento se realizó 3 veces. Las semillas fueron asperjadas con agua destilada estéril cada 12h y el número de semillas germinadas se determinó cada 24 horas por 72h.

El porcentaje de germinación de las semillas se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de germinación} = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número de semillas sembradas}} \times 100$$

4.2.5. Evaluación del efecto de las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de plántula de Berenjena. Para evaluar los efectos de las cepas de *Trichoderma* sobre plántulas de berenjena, semillas de la variedad C-015 fueron inoculadas, separadamente, con las cepas de *Trichoderma* spp., usando la metodología anteriormente descrita. Las semillas inoculadas fueron sembradas en almácigos de 128 viales, con turba canadiense, previamente esterilizada a 15 psi durante 1h. Semillas no inoculadas fueron usadas como control. Cuando las plántulas tuvieron dos hojas verdaderas, se trasplantaron a contenedores de Icopor (710 g) con un sustrato en proporciones 3:1 (arena: suelo de aluvión) esterilizado y posteriormente inoculado con las cepas de *Trichoderma* spp. a una concentración de 1×10^{10} conidias / g de suelo y un testigo sin aplicación alguna de *Trichoderma* spp. y con aplicación de fertilizante Robusto®. cada una de las cepas y el testigo conformó un tratamiento (11 tratamientos), constituidos por 4 repeticiones.

El estudio se realizó en condiciones de casa malla en la Facultad de Ciencias Agrícolas, a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 12/12 luz/oscuridad. Setenta días después del trasplante, las plantas fueron procesadas, separando cuidadosamente el suelo de la raíz y posteriormente las raíces fueron cuidadosamente lavadas con agua hasta separar completamente las partículas del suelo. Se determinaron las siguientes variables:

- **Masa seca raíz (MSR) y tallo (MST):** Se cortaron las raíces a la altura de la corona de la misma y la parte foliar y las raíces se colocaron en bolsas de papel completamente identificadas con el tratamiento y repetición. Se colocaron en un horno de secado a 105°C , durante 24 horas. Posteriormente, los tejidos fueron pesados en una balanza de precisión.
- **Masa seca total (MT):** Es la sumatoria de los pesos secos de la raíz y tallo.
- **Altura de planta (AP):** Se midió la longitud comprendida desde la cicatriz de los nudos cotiledonales hasta el último nudo de la planta.
- **Número de hojas (#):** Este se determinó contando las hojas completamente expandidas en la planta al momento de procesar la planta.
- **Número de nudos (#):** Se contaron los nudos presentes en el tallo a partir de los nudos cotiledonales hasta el último nudo de la planta.
- **Longitud de raíz (LRAÍZ):** Se realizó midiendo desde el cuello de raíz hasta el extremo más distal de la misma.

4.2.6. Diseño experimental: Para la evaluación de las cepas en la promoción del crecimiento en plántulas los experimentos se realizaron bajo condiciones de laboratorio y casa-malla. Para la evaluación de laboratorio se realizaron experimentos bajo un diseño en bloque de germinación el cual constó de un testigo (semillas sin inoculación del hongo) y semillas inoculadas con las diferentes cepas, este experimento se constituyó de 3 repeticiones por cepa y se realizará 3 veces.

El experimento realizado en campo se hizo en contenedores de icopor, los cuales contenían 710g de suelo cada una, bajo un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), cuyos tratamientos estaban conformados por un testigo (sin inoculación de cepas) y diferentes cepas de *Trichoderma* spp., con cuatro replicas por tratamiento, para un total de 44 unidades experimentales (UE). Cada UE contó con 1 planta.

4.2.7. Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó mediante la evaluación de la significancia de los efectos de la inoculación de las cepas nativas sobre la capacidad antagónica en el cultivo dual, en la evaluación de la germinación en laboratorio y en el análisis del crecimiento de las plántulas. Se utilizará la prueba de comparación de medias de Least significant difference (LSD) de Fisher para comparar medias entre los diferentes tratamientos. Los datos se analizaron con el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.1 para cada uno de los experimentos antes descritos.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Capacidad antagónica in vitro de cepas de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium* sp. En la Tabla 4.2 se resumen los coeficientes de variación para las tres evaluaciones del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), los cuadrados medios y la significancia estadística para el efecto antagónico de las diez cepas de *Trichoderma* empleadas en este estudio. Estos resultados acusaron diferencias significativas ($Pr \leq 0,05$) para el primer día de observación (PICR 1) y diferencias altamente significativas ($Pr \leq 0,01$) para el día dos y tres de evaluación (PICR 2 y PICR 3).

De acuerdo con la variabilidad observada, los mayores coeficientes de variación (CV) expresados en porcentaje, se presentaron para PICR 1 con el 30,40%, seguido por PICR 2 con 10,29% y PICR 3 con 8,78% (Tabla 4,2); evidenciando, que los datos de inhibición fueron más dispersos con respecto al valor medio en los primeros días de crecimiento *in vitro*. Ello mostró que algunas cepas requirieron de más tiempo para alcanzar el mismo nivel de parasitismo que las cepas contrastantes.

Tabla 4.2. Cuadrados medios, coeficientes de variación y nivel de significancia del análisis de varianza para el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR).

FV	gl	PICR 1 (%)	PICR 2 (%)	PICR 3 (%)
Tratamientos (cepas)	9	267,602611*	115,498222**	76,534611**
Error	50	96,744100	33,232867	26,340767
CV (%)		30,40	10,29	8,78

FV: fuentes de variación; CV (%): coeficiente de variación; gl: grados de libertad; **: significativos al 1% ($Pr \leq 0,01$); *: significancia al 5% ($Pr \leq 0,05$); PICR1: porcentaje de inhibición de crecimiento radial día 1; PICR 2: porcentaje de inhibición de crecimiento radial día 2; PICR 3: porcentaje de inhibición de crecimiento radial día 3.

En la Tabla 4.3 se detallan las diferencias estadísticas entre tratamientos para los tres días de evaluación del PICR. Se observó que, en el primer día, los mayores valores de inhibición de *Sclerotium* sp. *in vitro*, lo presentaron los aislamientos T004 (*Trichoderma* spp. sin identificar), T009 (*Trichoderma* sp.) y T006 (*Trichoderma* sp.) (44,81%, 40,13% y 33,80%, respectivamente); mientras que, el menor porcentaje de invasión fue presentado T002 (25,40%) y el T0010 (24,83%), correspondientes a la cepa de *Trichoderma* spp. sin identificar y a la especie *Trichoderma asperellum*.

En segundo día de observación (PICR 2), todas las cepas de *Trichoderma* spp. continuaron creciendo de manera similar (Tabla 3). Sin embargo, el T004 (*Trichoderma* spp. sin identificar), continuó presentando el mayor PICR con 63,70%, seguido por T002 (*Trichoderma* sp.), T005 (*Trichoderma virens*) y T003 (*Trichoderma* spp. sin identificar), los cuales presentaron índice 2 de antagonismo. En general, en el PICR 2, todos los aislamientos habían alcanzado más del 50% de

antagonismo, excepto *T. asperellum* (T0010), el cual presentó 48,24% en su capacidad antagónica.

La capacidad antagónica se incrementó para el PICR 3 en la mayoría de los tratamientos, excepto para T004 (*Trichoderma* spp. sin identificar) y T005 (*Trichoderma virens*), los cuales disminuyeron el crecimiento *in vitro* a razón de 7,5% y 4,07%, respectivamente. El mayor crecimiento radial lo presentó el T002 con 63,98%, seguido de los T008 (*T. asperellum*), T003 (*Trichoderma* spp. sin identificar), T001 (*Trichoderma lixii*) T007 (*T. asperellum*) y T004 (*Trichoderma* spp. sin identificar) (60,93, 60,85, 60,70, 60,18 y 59,21% de crecimiento radial, respectivamente) los cuales presentaron índice 2 de antagonismo.

Pese a que los aislamientos T004 (*Trichoderma* spp. sin identificar) y T005 (*Trichoderma virens*), consistentemente presentaron mejor mejor crecimiento radial en las dos primeras observaciones, al final del estudio, su capacidad de colonización disminuyó. Ello pudo estar determinado por una menor producción del complejo quimiotrófico de *Trichoderma*, específicamente los inductores de resistencia involucrados en la actividad microparasítica, estimulado por moléculas procedentes del mismo, como aminoácidos y azúcares; el reconocimiento mediado por lectinas, así como la formación de garfios o estructuras parecidas a apresorios que contienen (Cruz-Triana et al., 2017). La supresión de dicho crecimiento antagónico podría disminuir el interés hacia estos aislamientos como biocontroladores de *Sclerotium* sp. (Guédez et al., 2012). Resultados similares fueron encontrados por Garrido-Rondoy y Vilela-Severino (2019), al evaluar 14 cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de diferentes campos arroceros las cuales presentaron un rápido desarrollo *in vitro* a las 48 y 72 horas.

La actividad microparasítica de cepas nativas de *Trichoderma* sp. ha sido demostrada *in vitro* por Insuasty et al., (2014) para el control de *Fusarium oxysporum* y los resultados han sido similares a los que aquí se exponen, en el sentido de que existe supresión del crecimiento diferencial de *Sclerotium*; otros autores (Barbosa y Mena, 2009; Corrêa et al., 2007; Michael - Aceves, 2019) han encontrado que el crecimiento *in vitro* de *Fusarium*, *Sclerotium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora* es suprimido por cepas nativas de *Trichoderma* sp., concluyendo de manera general que las presentaron un modo de acción favorable tanto por competencia de espacio como por nutrientes.

Adicionalmente, la capacidad antagónica de las cepas nativas, suele ser más eficiente que el uso de microorganismos comerciales provenientes de condiciones agrológicas condiciones agrológicas diferentes (Mendoza et al., 2015; Martínez et al., 2015; Sánchez-García et al., 2017). Por esta razón, los aislamientos T002, T008, T003 (*Trichoderma* spp. sin identificar), T001 (*Trichoderma lixii*), T007 (*Trichoderma asperellum*) y T004 (*Trichoderma* spp. sin identificar), se podrían priorizar para el control biológico de *Sclerotium* en cultivos agrícolas en Montería, debido a que son

microorganismos eficaces adaptados al sitio y han convivido en nichos ecológicos específicos con los fitopatógenos del suelo.

Estudios similares realizados en Montería, mostraron la capacidad biocontroladora de cepas nativas *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. Las cepas nativas presentaron índice de supresión de 4, superiores a los aquí observados (Ramos et al. 2009)

El uso de cepas nativas o comerciales de *T. asperellum* han sido utilizadas en diferentes estudios que han demostrado su efectividad para el control de diferentes enfermedades en el corto y largo plazo, tanto en condiciones *in situ* como *in vitro* (Cruz-Triana et al., 2017; Herrera-Téllez et al., 2019). Sin embargo, en este estudio, esta especie de *Trichoderma* no presentó alta capacidad biocontroladora. Ello probablemente debido a la la producción de inductores de resistencia (elicitores) que muy probablemente estuvieron involucrados en porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Sclerotium* (Cordo et al., 2017; Vinale et al., 2008).

Tabla 4.3. Valores medios y diferencias estadísticas para el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de *Trichoderma* spp. contra *Sclerotium* sp.

Tratamientos (Cepas)	PICR 1 (%)	PICR 2 (%)	PICR 3 (%)
T001	31,26 bcd	54,88 bcd	60,70 ab
T002	25,40 d	59,63 ab	63,98 a
T003	27,95 cd	58,83 abc	60,85 ab
T004	44,81 a	63,70 a	59,21 abc
T005	30,96 bcd	59,06 ab	56,75 bcd
T006	33,80 abcd	52,25 dc	53,81 dc
T007	26,90 cd	54,96 bc	60,18 ab
T008	37,48 abc	55,06 bc	60,93 ab
T009	40,13 ab	53,60 bcd	55,08 bcd
T0010	24,83 d	48,23 d	53,16 d
Media	32,35	56,02	58,46
CV (%)	30,40	10,29	8,78

PICR 1: Porcentaje de inhibición de crecimiento radial día 1; PICR 2: porcentaje de inhibición de crecimiento radial día 2; PICR 3: porcentaje de inhibición de crecimiento radial día 3; CV (%): coeficiente de variación, promedios con la misma letra son estadísticamente iguales, según el test LSD ($\alpha = 0,05$).

4.3.2. Efecto de las cepas de *Trichoderma* sobre la germinación de semillas de Berenjena en laboratorio. La evaluación de las cepas de *Trichoderma* tuvieron algún efecto sobre la germinación de las semillas luego de 72 horas, de manera que se encontraron resultados diferenciales ($Pr \leq 0,01$) entre las 10 cepas y la prueba testigo (Tabla 4.4). Efectivamente, el T001 (*Trichoderma lixii*) generó el mayor porcentaje de semillas germinadas con 88,75%; seguido por el T002 con 80,50%, el cual además generó el mayor PICR al tercer día de evaluación (72 horas). Una respuesta similar fue encontrada para el T005 (*Trichoderma virens*) que permitió la germinación del 75,75% de las semillas. Por su parte, los T004 (*Trichoderma* spp. sin identificar), T006 (*Trichoderma* sp.) T007 (*Trichoderma asperellum*), T008 (*Trichoderma asperellum*), T009 (*Trichoderma* sp.) y T0010 (*Trichoderma asperellum*) tuvieron una respuesta más baja y similar en la germinación de las semillas que varió de 71,00% a 74,00% (Tabla 4.5, Figura 4.1).

Tabla 4.4. Resultados del análisis de varianza para el porcentaje de germinación G72 (germinación a las 72 horas) de semillas de *Solanum melongena* tratadas con *Trichoderma* spp. (1×10^8 conidias/gr de suelo).

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr > F
Tratamientos	10	2991,227273	299,122727	3,59**	0,0026
Error	33	2747,750000	83,265152		
Total	43	5738,977273			
CV (%)	12,16				

gl: Grados de libertad; **: Diferencias significativas al 1% ($Pr \leq 0,01$); CV: Coeficiente de variación.

Estos efectos pueden ser respuesta a la producción de promotores del crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) los cuales son liberados al medio y ayudan a la germinación de las semillas (Altomare et al., 1999). Diferentes autores (Martínez-Medina, 2014; Herrera-Jiménez et al., 2018; Jaroszuk-Ścisiel et al., 2019) han demostrado cómo ha sido el desempeño de *Trichoderma* spp. en la síntesis de fitohormonas; concordando en que la síntesis de ácido indol-butírico (AIB), ácido indol-acético (AIA) y ácido giberélico (GA), además de la síntesis de desaminasas, tiene un efecto promotor del crecimiento.

Incrementos adecuados y similares en la germinación a los aquí expuestos fueron encontrados por Santana-Baños et al. (2016) en semillas de tomate tratadas con *T. harzianum* y FitoMas-E® (cepa comercial); Cubillos-Hinojosa et al. (2009) en semillas de maracuyá tratadas con la cepa nativa TCN-014 y TCC-005 (cepa comercial); Muñoz y Maniscalco (2014) en semillas de arroz que incrementaron el porcentaje velocidad de germinación al tratarlas con *T. harzianum* y *T. asperellum*;

Asaduzzaman et al., (2010), quienes incrementaron el vigor germinativo de semillas de ají al evaluar cinco cepas de *T. harzianum*.

En efecto, aumentos en la germinación asegura una menor pérdida de semillas y menores costos variables en insumos; asimismo, una germinación adecuada es fundamental para el crecimiento vigoroso de las plántulas, confiere mayor resistencia a plagas, enfermedades y fisiopatías, tanto en semilleros como en condiciones de campo abierto (Aramendiz-Tatis et al., 2013; Barraza, 2017; Neto et al., 2017).

Tabla 4.5. Valores medios y diferencias estadísticas para el porcentaje de germinación de semillas *Solanum melongena* tratadas con *Trichoderma* spp. (1×10^8 conidias/gr de suelo).

Tratamientos (Cepas)	G72 (%)
Testigo	57,000 c
T001	88,750 a
T002	80,500 ab
T003	87,750 a
T004	73,500 b
T005	75,750 ab
T006	74,000 b
T007	73,000 b
T008	71,750 b
T009	72,250 b
T0010	71,000 b
Media	75,022
CV (%)	12,16

G72: germinación a las 72 horas (%); CV (%): coeficiente de variación. Promedios con la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD ($\alpha = 0,05$).

4.3.3. Efecto de las cepas de *Trichoderma* sobre el crecimiento de plántulas de Berenjena. En la tabla 4.6 se resumen los cuadrados medios y el coeficiente de variación para las siete variables estudiadas. Se evidenciaron efectos significativos de las diferentes cepas evaluadas sobre masa seca de tallo (MST), masa seca de raíz (MSR), masa seca total (MT), altura de planta (AP) y longitud de la raíz (LRAÍZ); sin embargo, el número de hojas (NH) y número de nudos (NN) no presentaron diferencias estadísticas. Resultados similares en cuanto a la mayor o menor efecto promotor del crecimiento de cepas nativas de *Trichoderma* fueron encontrados en

los trabajos de Contreras-Cornejo et al. (2009), Camargo-Cepeda y Ávila (2014), Candellero et al. (2015), Hajieghrari y Mohammadi (2016).

Tabla 4.6. Cuadrados medios y nivel de significancia para la masa seca de tallo (MST), masa seca de raíz (MSR), masa seca total (MT), altura de planta (ALT), número de hojas (NH), número de nudos (NN) y longitud de raíz (LRAÍZ) de berenjena.

FV	gl	MST	MSR	MT	AP	NH	NN	LRAÍZ
Tratamientos (cepas)	10	0,05773 **	0,003221 *	0,084167 **	35,63063 **	1,14090 ns	0,27272 ns	145,1409 *
Error	33	0,0011	0,016696	0,019364	4,80462	0,681818	0,310606	52,7196
CV (%)		37,54	23,91	21,91	8,99	20,88	11,10	37,63

FV: fuentes de variación; CV (%): coeficiente de variación; gl: grados de libertad; **: significativos al 1% ($Pr \leq 0,01$); *: significancia al 5% ($Pr \leq 0,05$); ns: no significativo ($Pr > 0,05$).

Los valores de dispersión para las variables de crecimiento se agruparon de la siguiente manera: CV bajos para AP y NN; CV medios para MSR, MT y NH; y CV altos para MST y LRAÍZ. Estos valores son adecuados para el análisis y discusión de los valores medios determinados en este estudio.

4.3.3.1. Masa seca de tallo (MST). Como se mencionó arriba, las cepas de *Trichoderma* evaluadas tuvieron algún efecto sobre la biomasa del tallo de berenjena, bajo las condiciones del experimento. Para esta variable, los valores medios más altos fueron presentados por sistemáticamente por los T008 (*Trichoderma asperellum*) (0,74 g), T006 (*Trichoderma* sp.) (0,715 g), T005 (*Trichoderma virens*) (0,567 g) y T004 (*Trichoderma* spp. sin especificar) (0,592 g). Coincidentemente, la cepa *T. asperellum* se caracterizó como uno de los mejores tratamientos en la inhibición del crecimiento radial de *Sclerotium* luego de las 72 horas de observación (Tabla 4.3 y 4.7).

4.3.3.2. Masa seca de raíz (MSR). El uso de las cepas de *Trichoderma* favoreció el incremento de biomasa de las raíces de berenjena, los mejores resultados fueron presentados, en su orden, por el T005 (*T. virens*) (0,127 g), T008 (*Trichoderma asperellum*) (0,117 g), T006 (*Trichoderma* sp.) (0,110 g), T003 (*Trichoderma* spp. sin especificar) (0,100 g), T007 (*Trichoderma asperellum*) (0,100 g) y el T004 (*Trichoderma* spp. sin especificar) (0,097 g). En estos tratamientos, la cepa *T. virens* isolate (T005) y *T. asperellum* isolate (T008) acusaron la mejor respuesta de las

raíces, lo cual evidencia su capacidad promotora del crecimiento de las plántulas (Tabla 4.7).

Como sabemos, un sistema radicular sano y una mayor biomasa de raíces, es proporcional a la absorción de nutrientes desde la solución del suelo, lo cual se traduce en el crecimiento adecuado en las etapas iniciales del cultivo (Goss et al., 1993; Hoyos-Carvajal et al., 2015; Gómez-Carabalí, 2010). De manera similar, Pelagio-Flores et al. (2017) demostró que la arquitectura de las raíces se modifica cuando en el suelo hay conidios de *Trichoderma*, pues se altera la redistribución de auxinas dentro de las células; asimismo, la interacción del pH del suelo con el crecimiento de la raíz, parece desfavorecer el crecimiento cuando se aplica *Trichoderma atroviride*.

4.3.3.3. Masa seca total (MT). Una mayor masa seca total fue presentada, en su orden, por los tratamientos T008 (*Trichoderma asperellum*) (0,856 g), T006 (*Trichoderma* sp.) (0,825 g), T005 (*Trichoderma virens*) (0,700 g) y T004 (*Trichoderma* spp. sin especificar) (0,695 g). Como sucedió para la MST y MSR, la cepa *T. asperellum isolate* (T008) provocó un mayor incremento para esta variable, lo cual, evidentemente, favorece la dinámica de crecimiento en las etapas de mayor eficiencia fisiológica (Pommerening y Muszta, 2015) (Tabla 4.7).

4.3.3.4. Altura de planta (AP). La altura de las plantas fue favorecida de manera diferencial por el efecto promotor de la cepa *T. asperellum isolate* (T008) y por la cepa *Trichoderma* sp. *Isolate* (T006), los cuales presentaron valores estadísticamente similares de 29,350 cm y 28,950 cm, respectivamente. Otras cepas en los tratamientos T003 (*Trichoderma* spp. sin especificar) (25,225 cm), T004 (*Trichoderma* spp. sin especificar) (24,375 cm) y T005 (*Trichoderma virens*) (24,375 cm) generaron resultados similares y promisorios para estimular el crecimiento de plántulas (Tabla 4.7).

4.3.3.5. Número de hojas (NH). Cuando se evaluaron el número de hojas promedio, todas las cepas ocasionaron valores promedios estadísticamente similares para dicha variable; estos resultados fueron relativamente dispersos (CV = 20,88%), por lo cual, la respuesta observada puede estar sujeta a características fenotípicas de las plantas que poco, o nada, se pueden modificar por efectos aleatorios como los que en este estudio de evaluaron (Tabla 4.7).

4.3.3.6. Número de hojas (NN). Al tiempo, el número de nudos promedio presentó comportamientos estadísticamente similares entre tratamientos (cepas). Dado que los nudos son el sitio de aparición de las hojas, es coherente que los efectos de *Trichoderma* sobre estas variables haya sido similar (Tabla 4.7).

4.3.3.7. Longitud de raíz (LRAÍZ). La longitud de las raíces presentó los mayores valores variables, de modo que las cepas aplicadas generaron respuestas diferenciales; los mayores valores fueron expresados por los tratamientos T003

(*Trichoderma* spp. sin especificar) (27,25 cm), T010 (*Trichoderma asperellum*) (26,75 cm), T006 (*Trichoderma* sp.) (22,25 cm), T009 (*Trichoderma* sp.) (26,00 cm), T005 (*Trichoderma virens*) (20,25 cm) y T008 (*Trichoderma asperellum*) (18,75 cm). Si bien, *Trichoderma*, además de actuar como agente antagónico de fitopatógenos, también es una gente bioinoculante que coloniza las raíces de las plantas y promueve su crecimiento y a su vez ayuda a la absorción de nutrientes del suelo (Tabla 4.7).

Nieto-Jacobo et al. (2017) han indicado *Trichoderma* confiere un mejor crecimiento, resistencia a enfermedades y tolerancia al estrés abiótico a huéspedes de las plantas, del mismo modo, muchas cepas tienen la capacidad de producir ácido indol-3-acético (IAA), por medio de la cual se ha sugerido que su producción promueve el crecimiento de las raíces.

La longitud de las raíces se ve favorecida con el uso de *Trichoderma*, debido a que estos microbios cambian las propiedades fisicoquímicas de la rizosfera, entre otras cosas produciendo exopolisacáridos y formando biopelículas (Khadka y Uphoff, 2019).

Diversos estudios recientes elaborados por Zhang et al. (2016) en trigo, Nieto et al. (2017) en *Arabidopsis*, Ban et al. (2018) en tomate y frijol, Khadka y Uphoff (2019) en arroz y Halifu et al. (2019) han demostrado que *Trichoderma* actúa como potencial promotor del crecimiento y el desarrollo de los cultivos, debido a que mejora el crecimiento de las fibrillas, incrementa la tolerancia a eventos adversos como la salinidad del suelo, actúa como un sistema de raíces inoculado que ayuda a la absorción de agua y nutrientes en solución.

En relación a la mayor tolerancia al estrés abiótico, Redman et al. (2011) y Grover et al. (2011), indican que *Trichoderma* induce osmoprotectores y proteínas de choque térmico en las células, lo que hace que la planta sea más capaz de resistir el estrés abiótico como la salinidad, la sequía, el frío y las altas temperaturas.

Singh et al. (2014) y Li et al. (2015) demostraron que el tratamiento de semillas de tomate con *Trichoderma* spp. generó incrementos considerables en el crecimiento y el contenido de clorofila, asimismo, ayudó a la absorción de nutrientes minerales, a través mecanismos indirectos de solubilización mediante acidificación, redox, quelación e hidrólisis. Esta podría ser una respuesta similar acusada por las plantas de berenjena bajo las condiciones del estudio.

Tabla 4.7. Valores medios para la masa seca de tallo (MST), masa seca de raíz (MSR), masa seca total (MT), altura de planta (ALT), número de hojas (NH), número de nudos (NN) y longitud de raíz (LRAÍZ) de berenjena.

Tratamientos (Cepas)	MST (g)	MSR (g)	MT (g)	AP (cm)	NH (#)	NN (#)	LRAÍZ (cm)
Testigo	0,377 d	0,045 c	0,425 d	24,900bc	4,00a	5,25a	10,75de
T001	0,367 d	0,042 c	0,412 d	21,900c	4,00a	4,75a	9,50e
T002	0,527 cd	0,077 bc	0,607 cd	24,200bc	4,25a	5,25a	18,25abcd
T003	0,547 bcd	0,100 ab	0,650 bc	25,225b	3,75a	5,25a	27,25a
T004	0,592 abc	0,097 ab	0,695 abc	24,375bc	4,00a	5,00a	15,75cde
T005	0,567 abc	0,127 a	0,700 abc	24,375bc	3,50a	5,00a	20,25abcd
T006	0,715 ab	0,110 ab	0,825 ab	28,950a	4,50a	5,00a	22,25abc
T007	0,542 bcd	0,100 ab	0,647 bc	23,800bc	3,00a	4,50a	16,75bcde
T008	0,740 a	0,117 ab	0,865 a	29,350a	5,00a	5,25a	18,75abcde
T009	0,422 cd	0,072 bc	0,500 cd	18,700d	3,50a	4,75a	26,00abc
T010	0,545 bcd	0,112 ab	0,660 bc	22,450bc	4,00a	5,25a	26,75ab
Media	0,540	0,091	0,635	24,38409	3,95	5,0	19,295
CV (%)	23,91	37,54	21,91	8,99	20,88	11,10	37,63

CV (%): coeficiente de variación. Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales, según el test LSD ($\alpha = 0,05$).

De acuerdo con el estímulo del crecimiento a través de fitohormonas, Martínez-Medina et al. (2014) encontró una fuerte asociación de la inducción de auxinas con la estimulación del crecimiento de las plantas de melón tratadas con *Trichoderma*. La capacidad protectora de la enfermedad de las cepas de *Trichoderma* contra la infección por *F. oxysporum* parece estar más relacionada con las alteraciones inducidas en el contenido de las hormonas del ácido abscísico, etileno y la citoquinina transzeatina ribósido, que con la actividad antagonista in vitro contra *F. oxysporum*.

4.4. CONCLUSIONES

Los aislamientos de *Trichoderma* spp., encontradas en suelos de la zona productora de berenjena del departamento de Córdoba tienen capacidad biocontroladora sobre *S. rolsfii* in vitro (*T. asperellum*) y T003), promueven la germinación de semillas T001 (87,750%), T003 (87,750%) y T002 (80,500%) y el crecimiento de plántulas en casa malla (T005 (*Trichoderma virens*) y T008 (*Trichoderma asperellum*), en la parte foliar; T003 (*Trichoderma* spp. no identificado) y T009 (*Trichoderma* sp.) en raíces) por lo que pueden ser utilizadas en programas de manejo fitosanitario y nutricional de este cultivo.

4.5. LITERATURA CITADA

Adams, P. (1990). The Potential of Mycoparasites for Biological Control of Plant Diseases. *Annu. Rev. of Phytopathol.*, 28, 59-72. doi: 10.1146/annurev.py.28.090190.000423

Agronet. (2020). Estadísticas de Área, Producción y Rendimientos. Sistema de Estadísticas Agropecuarias. Disponibles en: <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>

Altomare, C., W.A. Norvell, T. Björkman y G.E. Harman. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microb.* 65(7), 2926- 2933.

Aramendiz, H., Cardona, C. y Correa, E. (2014). Parámetros genéticos en berenjena. *Revista U.D.C.A.* 17(2): 309 – 310. Doi: <https://doi.org/10.31910/rudca.v17.n2.2014.238>

Araméndiz-Tatis, H., Cardona-Ayala, C. y Correa-Álvarez, E. (2013). Efecto de diferentes sustratos en la calidad de plántulas de berenjena (*Solanum melongena* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(1), 55-61.

Arcia, A. (1995). Uso de Antagonistas en el Control de Fitopatógenos del Suelo. En Curso sobre Control Microbial de Insectos Plagas y Enfermedades en Cultivos. Seminario en la Universidad Centro Occidental (UCLA). Barquisimeto - Venezuela. 20p.

Asaduzzaman, M., Alam, M. J. y Islam, M. M. (2010). Effect of *Trichoderma* on seed germination and seedling parameters of chili. *Journal of Science Foundation*, 8(1-2), 141-150.

Asis, A. Siddiquee, S. (2016), identification of *Trichoderma* Species From Wet Paddy Field Soil Samples. Biotechnology Research Institute, Universiti Malaysia Sabah, Jalan UMS, 88400, Kota Kinabalu.

Ban, G., Akanda, S. y Maino, M. (2018). The effect of *Trichoderma* on the growth and development of tomato and bean under greenhouse and field conditions. *Annals of Tropical Research*, 10.

Barbosa, R. J. F. y Meza, C. L. S. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 62(1), 4743-4748.

Barraza, F. (2017). Crecimiento y calidad morfológica de berenjena (*Solanum melongena* L.) en fase de semillero.

Bautista, G., Mendoza, H. y Uribe, D. (2007). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Biologica colombiana*, 12(1), 19-32.

Camargo-Cepeda, D. F. y Ávila, E. R. (2014). Efectos del *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). *Ciencia y Agricultura*, 11(1), 91-100.

Candelero, D. J., Cristóbal, A. J., Reyes, R. A., Tun, S. J., Gamboa, A. M. y Ruíz, S. E. (2015). *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagónicas contra *Meloidogyne incognita*. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 84(1), 113-119.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. y López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(3), 1579-1592.

Cordo, C. A., Monaco, C. I., Segarra, C. I., Simon, M. R., Mansilla, A. Y., Perelló, A. E., Conde, R. D., et al. (2007). *Trichoderma* spp. as elicitors of wheat plant defense responses against *Septoria tritici*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(7), 687-698.

Corrêa, S., Mello, M., Ávila, Z. R., Braúna, L. M., Pádua, R. R. y Gomes, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11(1), 3-9.

Cruz-Triana, A., Rivero-González, D., Martínez-Coca, B., Echevarría-Hernández, A. y Tania-Rodríguez, A. (2017). Evaluación de la actividad antifúngica de *Trichoderma asperellum* Samuels ante patógenos fúngicos que afectan al cultivo de la soya (*Glycine max* L.). *Cultivos Tropicales*, 38(4), 15-21.

Cubillos-Hinojosa, J., Valero, N. y Mejía, L. (2009). *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, 27(1), 81-86.

FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. (2020). Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

Garrido-Rondoy, M. y Vilela-Severino, N. (2019). Capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* frente a *Rhizoctonia*, *Nakatea sigmoidea* y *Sclerotium rolfsii* y su efecto en cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de cultivos de arroz. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 199-206.

Gato, Y., Pérez, Y., Carreras, B., Baró, Y., Quesada, Y. y Ramírez, R. (2014). Actividad antagónica de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. frente a fitopatógenos de suelo. *Fitosanidad*, 18(1), 45-48.

- Gómez-Carabalí, A., Idupulapati Madhusudana, R., & Ricaute, J. (2010). Differences in root distribution, nutrient acquisition and nutrient utilization by tropical forage species grown in degraded hillside soil conditions¹. *Acta Agronómica*, 59(2), 197-210.
- Goss, M. J., Miller, M. H., Bailey, L. D., & Grant, C. A. (1993). Root growth and distribution in relation to nutrient availability and uptake. *European Journal of Agronomy*, 2(2), 57-67.
- Grover, M., Ali, S.Z., Sandhya, V., Rasul, A. y Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 1231–1240.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C. y Olivar, R. (2012). Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(1), 44-49.
- Hajjegrari, B. y Mohammadi, M. (2016). Growth-promoting activity of indigenous *Trichoderma* isolates on wheat seed germination, seedling growth and yield. *Australian Journal of Crop Science*, 10(9), 1339.
- Halifu, S., Deng, X., Song, X. y Song, R. (2019). Effects of Two *Trichoderma* Strains on Plant Growth, Rhizosphere Soil Nutrients, and Fungal Community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* Annual Seedlings. *Forests*, 10(9), 758.
- Herrera-Jiménez, E., Alarcón, A., Larsen, J., Ferrera-Cerrato, R., Cruz-Izquierdo, S. y Ferrera-Rodríguez, M. R. (2018). Comparative effects of two indole-producing *Trichoderma* strains and two exogenous phytohormones on the growth of *Zea mays* L., with or without tryptophan. *Journal of soil science and plant nutrition*, 18(1), 188-201.
- Herrera-Téllez, V. I., Cruz-Olmedo, A. K., Plasencia, J., Gavilanes-Ruíz, M., Arce-Cervantes, O., Hernández-León, S. y Saucedo-García, M. (2019). The protective effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 2007.
- Hoyos-Carvajal, L. (2012). *Trichoderma*: Identificación y prospectiva pp. 53-69. En: Martínez L. J. (ed.). *Avances de la investigación agronómica II*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Hoyos-Carvajal, L., Cardona, A., Osorio, W. y Orduz, S. (2015). Efecto de diversos aislamientos de *Trichoderma* spp. en la absorción de nutrientes en frijol (*Phaseolus vulgaris*) en dos tipos de suelo. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(2), 268-278.

Insuasty, C. E., Rodríguez, J. A., González, C. S. y García, C. B. (2014). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(2), 237-249.

Islam, M. R., Prova, A., Akanda, A. M. y Hossain, M. M. (2020). First report of white mould caused by *Sclerotinia sclerotiorum* on pea in Bangladesh. *Journal of Plant Pathology*, 1-1.

Iwuagwu, C. C., Okeke, D. O., Onejeme, F. C., Iheaturu, D. E., Nwogbaga, A. C. y Salaudeen, M. T. (2019). Effect of Plant Spacing on Yield and Disease Assessment on Two Varieties of Eggplant (*Solanum melongena* L.) in Awka.

Jaroszuk-Ścisiel, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Janusz, G, et al. (2019). Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4923.

Katoch et al. (2019). *Trichoderma* *lixii* (IIIM-B4), an endophyte of *Bacopa monnieri* L. producing peptaibols. *BMC Microbiology* <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1477-8>

Khadka, R. B. y Uphoff, N. (2019). Effects of *Trichoderma* seedling treatment with System of Rice Intensification management and with conventional management of transplanted rice. *PeerJ*, 7, e5877.

Köhl, J. (2006). Integrated disease management. Recuperado de https://orgrprints.org/8206/1/Integrated_disease_management-jkohl.pdf

Kredics, L., Hatvani, L., Naeimi, S., Körmöczi, P., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. Druzhinina, I. (2014). Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats. pp. 3-24. En: Gupta, I. G., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina I. y Tuohy, M. (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier, The Netherlands. Doi: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1.

Kubicek, C.P., Komon-Zelazowska, M. y Druzhinina, I.S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 9(10), 753–763. Doi: 10.1631/jzus.B0860015.

Li, R. X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q. R., Li, R. y Chen, W. (2015). Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PLoS One*, 10(6).

Mahmud, S. H., Hoque, A. T. M. R. y Mohiuddin, M. O. H. A. M. M. E. D. (2005). Germination behavior and initial growth performance of eight multipurpose tree species. *Int. J. Agric. Biol.*, 4, 539-542.

Martínez-Medina, A., Alguacil, M. D. M., Pascual, J. A. y Van Wees, S. C. (2014). Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *Journal of chemical ecology*, 40(7), 804-815.

Matsouri F., Björkman, T. y Harman, G.E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100, 1213-1221.

Mukherjee, A. K., Sampath Kumar, A., Kranthi, S. y Mukherjee P. K. (2014). Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains: isolation, evaluation and formulation. *3 Biotech.*, 4(3), 275 – 281. doi: 10.1007/s13205-013-0150-4

Mullen, J. (2001). Southern blight, Southern stem blight, White mold. The Plant Health Instructor. doi: 10.1094/PHI-I-2001-0104-01.

Muñoz, L. N. y Maniscalco, D. P. (2014). Tratamiento biológico del cultivo de arroz en condiciones de vivero empleando el hongo *Trichoderma* spp. *Interciencia*, 39(3), 185-190.

Nahar, M. S., Naher, N., Alam, M. J., Hussain, M. J., Yasmin, L., Mian, M. Y., Rosa, C., et al. (2020). Survey, morphology and white mold disease of country bean (*Lablab purpureus* L.) caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary in-relation to soil physico-chemical properties and weather conditions in Bangladesh. *Crop Protection*, 135, 104825.

Neto, F. J. D., Dalanhol, S. J., Machry, M., Pimentel, A., Rodrigues, J. D. y Ono, E. O. (2017). Effects of plant growth regulators on eggplant seed germination and seedling growth. *Australian Journal of Crop Science*, 11(10), 1277.

Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., Mendoza-Mendoza, A., et al. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in plant science*, 8, 102.

Pommerening, A. y Muszta, A. (2015). Methods of modelling relative growth rate. *Forest Ecosystems*, 2(1), 5. Doi: 10.1186/s40663-015-0029-4

Prova, A., Akanda, A. M., Islam, S. y Hossain, M. M. (2018). Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum*, an emerging fungal pathogen causing blight in hyacinth bean (*Lablab purpureus*). *The plant pathology journal*, 34(5), 367.

Redman, R.S., Kim, Y. O., Woodward, C. J. D. A., Greer, C., Espino, L., Doty, S.L. y Rodríguez, R.J. (2011). Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat

adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change. PLOS ONE. 2011;6:e14823.

Rejeb, I. B., Pastor, V. y Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants*, 3(4), 458-475.

Sánchez-García, B. M., Espinosa-Huerta, E., Villordo-Pineda, E., Rodríguez-Guerra, R. y Mora-Aviles, M. A. (2017). *Trichoderma* spp. Native strains molecular identification and in vitro antagonistic evaluation of root phitopathogenic fungus of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. MONTCALM. *Agrociencia*, 51(1), 63-79.

Sandoval, M. C., Fernández, M. V., Gilardino, M. S., Moreira, F. E., Piwowarczuk, C. y Ruiz, C. (2014). Enfermedades fúngicas que afectan al cultivo de berenjena (*Solanum melongena* L.) en la localidad El Pato, Berazategui.

Santana-Baños, Y., del Busto Concepción, A., González Fuentes, Y., Aguiar González, I., Carrodegua Díaz, S., Páez Fernández, P. L. y Díaz Lugo, G. (2016). Efecto de *Trichoderma harzianum* Rifai y FitoMas-E® como bioestimulantes de la germinación y crecimiento de plántulas de tomate. *Centro agrícola*, 43(3), 5-12.

Siddique, M. N. A., Ahmmed, A. N. F., Mazumder, M. G. H., Jahan, N., y Islam, M. R. (2018). Management of Foot and Root Rot Disease of Eggplant Caused by *Sclerotium rolfsii* under In vivo Condition. *Sci. Agri*. 21(3), 98-101. doi: 0.15192/PSCP.SA.2018.21.3.98101.

Singh, S. P., Singh, H. B., Singh, D. K. y Rakshit, A. (2014). *Trichoderma*-mediated enhancement of nutrient uptake and reduction in incidence of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Egyptian Journal of Biology*, 16, 29-38.

Suárez, L. y Cabrales, C. P. (2008). Identificación de especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *Moniliophthora roreri* en el departamento de Norte de Santander. *Respuestas*, 13(1), 45-56.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti D.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. (2008) *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40:1–10. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.07.002.

Xu, Z., Harrington, T. C., Gleason, M. L. y Batzer, J. C. (2010). Phylogenetic placement of plant pathogenic *Sclerotium* species among teleomorph genera. *Mycologia*, 102(2), 337-346.

Whipps y Budge (1990). A Method to Screen *Trichoderma* Isolates Against Soil Sclerotial Fungi and *Armillaria* Root Rot. *Biological Control of Plant Diseases* pp 427-430.

Zhang, S., Gan, Y. y Xu, B. (2016). Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Frontiers in plant science*, 7, 1405.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

5. DISCUSIÓN GENERAL

La determinación de cepas de *Trichoderma* spp. en suelos de cultivos, su caracterización molecular y la evaluación específica de la capacidad promotora de crecimiento y biocontroladora de hongos patógenos como *Sclerotium* sp., ha sido una temática de interés en diferentes estudios que han contribuido, vehementemente, a la agricultura limpia o sin agroquímicos (Kannangara et al. 2017; Khedarani y Sinha, 2018; Zin y Badaluddin, 2020).

En este estudio se encontraron cepas diferenciadas de *Trichoderma* spp. entre los suelos de los municipios analizados, lo cual puede estar asociado a las propiedades intrínsecas del suelo, su manejo, las condiciones climáticas y el tipo de cultivo establecido (Okoth et al., 2009; Asha et al., 2013; Amir-Ahmadi et al., 2017). La presencia de estos hongos garantiza algún grado de control biológico endémico y una mayor capacidad de crecimiento de las plantas establecidas, mediante la producción de formas solubles de nutrientes minerales y metabolitos promotores del crecimiento (Hoyos-Carvajal et al. 2009; Smith et al., 2013).

A pesar de que la metodología de extracción fue igual en todos los muestreos, en uno de los municipios (Montería) no se evidenciaron estructuras completas o restos de estas que correspondieran a *Trichoderma*, lo que puede deberse a condiciones edafológicas o de manejo del cultivo que han impedido la adaptación del hongo, mayor tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el procesamiento de la misma (Hoyos-Carvajal et al. 2009; Kumar et al., 2017; Sharma et al., 2019).

En la caracterización morfométrica de las cepas, el crecimiento de micelios en caja Petri concordó con los hallazgos de Stocco (2014), quien indica que *Trichoderma* presenta un rápido crecimiento cuando se cultiva en medio PDA, pudiendo alcanzar diámetros de entre 7 y 9 mc en 72 h, los conidios son primero de color amarillo, llegando a ser de color amarillo-verdoso al madurar.

Aunque el estudio morfológico de las colonias es una herramienta potencial para su descripción taxonómica (Kannangara et al., 2017; Samuels, 2006), la disposición de métodos más específicos como los moleculares permiten obtener resultados con mayor claridad (Druzhinina et al., 2006). Las amplificaciones de nuestros aislados generaron fragmentos de 400 pb aproximadamente, evento que concordó con los estudios previos de Stocco (2014) y Asis y Siddiquee (2016), quienes evaluaron diferentes cepas nativas y foráneas *Trichoderma*.

El análisis de las secuencias de nucleótidos y su comparación con los reportes previos en el Genbank, permitió distinguir las especies *Trichoderma lixi* y *Trichoderma virens* agrupadas en el grupo I, especies que han sido reportadas por Katoch et al. (2019) y Whipps y Budge (1990), como hongos antagónicos del suelo con una amplia capacidad de supresión. La especie *Trichoderma asperellum*, agrupada en el grupo II, III y IV se ha reportado como una cepa con amplia

capacidad antagónica de *Fusarium* sp., *Cercospora kikuchii* y *Phakopsora pachyrhizi* (Cruz-Triana et al., 2017).

Cuando se analizó la capacidad biocontroladora *in vitro* de *Trichoderma* sobre *Sclerotium*, se determinó que el tiempo transcurrido desde la siembra de las cepas hasta la mayor actividad microparasítica era de 48 a 72 h, lo que concuerda con los hallazgos de Garrido-Rondoy y Vilela-Severino (2019). La menor capacidad de colonizadora fue acaso por las cepas T004 (*Trichoderma* spp.) y T005 (*Trichoderma virens*), efecto que muy posiblemente se debió a una menor producción del complejo quimiotrófico, específicamente los inductores de resistencia involucrados en la actividad antagónica y una reducción en el reconocimiento mediado por lectinas, así como la formación de garfios (Cruz-Triana et al., 2017). Los estudios de Insuasty et al. (2014), Barbosa y Meza (2009) y Corrêa et al. (2007) corroboran la capacidad que *Trichoderma* tiene sobre la inhibición del crecimiento sobre una diversidad de patógenos del suelo y han fundamentado su potencial uso en agricultura orgánica.

Los efectos promotores de *Trichoderma* sobre la germinación de semillas de berenjena presentaron una respuesta variable, positiva y significativa entre cepas; dicha respuesta positiva es acorde con la producción de promotores del crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas), los cuales son liberados al medio y ayudan a la germinación de las semillas (Altomare et al., 1999). De manera que diferentes autores han ayudado a comprender la síntesis de fitohormonas de *Trichoderma* spp. (Martínez-Medina, 2014; Herrera-Jiménez et al., 2018; Jaroszuk-Ścisiel et al., 2019); concordando en que la síntesis de ácido indol-butírico (AIB), ácido indol-acético (AIA) y ácido giberélico (GA), tiene un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas.

Asegurar una mayor capacidad germinativa es esencial para evitar incrementos de los costos variables en insumos; de manera que una germinación adecuada es fundamental para el crecimiento vigoroso de las plántulas, confiere mayor resistencia a plagas, enfermedades y fisiopatías, tanto en semilleros como en condiciones de campo abierto (Aramendiz-Tatis et al., 2013; Barraza, 2017; Neto et al., 2017).

De manera general, el crecimiento de berenjena se favoreció con la inoculación de estas cepas nativas; se espera que dichas plantas asuman una mayor resistencia a enfermedades y tolerancia al estrés abiótico debido a la mayor capacidad de producción de ácido indol-3-acético (IAA) que algunas cepas presentan (Nieto-Jacobo et al. (2017). El crecimiento y estructura del sistema radicular se mejora con el uso de *Trichoderma* (Zhang et al., 2016; Ban et al., 2018; Khadka y Uphoff, 2019; Halifu et al., 2019).

5.1. LITERATURA CITADA

- Altomare, C., W.A. Norvell, T. Björkman y G.E. Harman. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microb.* 65(7), 2926- 2933.
- Amir-Ahmadi, N., Moosavi, M. R. y Moafpourian, G. (2017). Effect of soil texture and its organic content on the efficacy of *Trichoderma harzianum* (MIAU 145 C) in controlling *Meloidogyne javanica* and stimulating the growth of kidney beans. *Biocontrol science and technology*, 27(1), 115-127.
- Aramendiz, H., Cardona, C. y Correa, E. (2013). Parámetros genéticos en berenjena. *Revista U.D.C.A.* 17(2): 309 – 310. Doi: <https://doi.org/10.31910/rudca.v17.n2.2014.238>
- Asha, N. N., Raghunandan, B. L. Shivaprakash, M. K. (2013). In vivo evaluation of *Trichoderma* spp. for Survival and their Population in Rhizosphere Soil of French Bean. *Madras Agricultural Journal*, 100(4-6), 554-558.
- Asha, N. N., Raghunandan, B. L. Shivaprakash, M. K. (2013). In vivo evaluation of *Trichoderma* spp. for Survival and their Population in Rhizosphere Soil of French Bean. *Madras Agricultural Journal*, 100(4-6), 554-558.
- Asis, A. Siddiquee, S. (2016), identification of *Trichoderma* Species From Wet Paddy Field Soil Samples. *Biotechnology Research Institute, Universiti Malaysia Sabah, Jalan UMS, 88400, Kota Kinabalu.*
- Ban, G., Akanda, S. y Maino, M. (2018). The effect of *Trichoderma* on the growth and development of tomato and bean under greenhouse and field conditions. *Annals of Tropical Research*, 10.
- Barbosa, R. J. F. y Meza, C. L. S. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa*) del municipio zona bananera colombiana. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 62(1), 4743-4748.
- Barraza, F. (2017). Crecimiento y calidad morfológica de berenjena (*Solanum melongena* L.) en fase de semillero.
- Corrêa, S., Mello, M., Ávila, Z. R., Braúna, L. M., Pádua, R. R. y Gomes, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11(1), 3-9.
- Cruz-Triana, A., Rivero-González, D., Martínez-Coca, B., Echevarría-Hernández, A. y Tania-Rodríguez, A. (2017). Evaluación de la actividad antifúngica de

Trichoderma asperellum Samuels ante patógenos fúngicos que afectan al cultivo de la soya (*Glycine max* L.). *Cultivos Tropicales*, 38(4), 15-21.

- Druzhinina, I. (2014). Biodiversity of the Genus *Hypocrea*/*Trichoderma* in Different Habitats. pp. 3-24. En: Gupta, I. G., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina I. y Tuohy, M. (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier, The Netherlands. Doi: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00001-1.
- Garrido-Rondoy, M. y Vilela-Severino, N. (2019). Capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* frente a *Rhizoctonia*, *Nakatea sigmoidea* y *Sclerotium rolfsii* y su efecto en cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de cultivos de arroz. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 199-206.
- Halifu, S., Deng, X., Song, X. y Song, R. (2019). Effects of Two *Trichoderma* Strains on Plant Growth, Rhizosphere Soil Nutrients, and Fungal Community of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* Annual Seedlings. *Forests*, 10(9), 758.
- Herrera-Jiménez, E., Alarcón, A., Larsen, J., Ferrera-Cerrato, R., Cruz-Izquierdo, S. y Ferrera-Rodríguez, M. R. (2018). Comparative effects of two indole-producing *Trichoderma* strains and two exogenous phytohormones on the growth of *Zea mays* L., with or without tryptophan. *Journal of soil science and plant nutrition*, 18(1), 188-201.
- Hoyos-Carvajal, L.M., Orduz, S. y Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genet. Biol.* 46(9), 615-31. doi: 10.1016/j.fgb.2009.04.006
- Insuasty, C. E., Rodríguez, J. A., González, C. S. y García, C. B. (2014). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(2), 237-249.
- Jaroszuk-Ścisiel, J., Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., Majewska, M., Hanaka, A., Janusz, G, et al. (2019). Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with these strain conidia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4923.
- Kannangara, S., Dharmarathna, R. M. G. C. S. y Jayarathna, D. L. (2017). Isolation, Identification and Characterization of *Trichoderma* species as a Potential Biocontrol Agent against *Ceratocystis paradoxa*. *The Journal of Agricultural Sciences*, 12(1), 51- 62 doi: 10.4038/jas.v12i1.8206
- Kannangara, S., Dharmarathna, R. M. G. C. S. y Jayarathna, D. L. (2017). Isolation, identification and characterization of *Trichoderma* species as a potential

- biocontrol agent against *Ceratocystis paradoxa*. *Journal of Agricultural Sciences–Sri Lanka*, 12(1). 51-62. <http://dx.doi.org/10.4038/jas.v12i1.8206>
- Katoch et al. (2019). *Trichoderma lixii* (IIIM-B4), an endophyte of *Bacopa monnieri* L. producing peptaibols. *BMC Microbiology* <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1477-8>
- Khadka, R. B. y Uphoff, N. (2019). Effects of *Trichoderma* seedling treatment with System of Rice Intensification management and with conventional management of transplanted rice. *PeerJ*, 7, e5877.
- Khedarani, K. y Sinha, B. (2018). Antagonistic Potential and Molecular Characterization of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* Infecting Ghost Pepper in Manipur, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7(02), 2085-2093. doi:10.20546/ijcmas.2018.702.248
- Kumar, G., Maharshi, A., Patel, J., Mukherjee, A., Singh, H. B. y Sarma, B. K. (2017). *Trichoderma*: a potential fungal antagonist to control plant diseases. *SATSA Mukhapatra-Annual Technical Issue*, 21, 206-218. Kumar, K., Amaesan, N., Bhagat, S., Madhuri, K. y Srivastava, R. C. (2012). Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. *Indian J. Microbiol*, 52(2), 137–144. Doi: 10.1007/s12088-011-0205-3
- Martínez-Medina, A., Alguacil, M. D. M., Pascual, J. A. y Van Wees, S. C. (2014). Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *Journal of chemical ecology*, 40(7), 804-815.
- Neto, F. J. D., Dalanhol, S. J., Machry, M., Pimentel, A., Rodrigues, J. D. y Ono, E. O. (2017). Effects of plant growth regulators on eggplant seed germination and seedling growth. *Australian Journal of Crop Science*, 11(10), 1277.
- Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., Mendoza-Mendoza, A., et al. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in plant science*, 8, 102.
- Okoth, S. A., Okoth, P. y Muya, E. (2009). Influence of soil chemical and physical properties on occurrence of *Trichoderma* spp. In Embu, Kenya. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 11(2), 303-312.
- Samuels, G. J. (2006). *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195-206.

- Sharma, S., Kour, D., Rana, K. L., Dhiman, A., Thakur, S., Thakur, P., ... y Yadav, A. N. (2019). *Trichoderma*: biodiversity, ecological significances, and industrial applications. In Recent advancement in white biotechnology through fungi (pp. 85-120). Springer, Cham.
- Smith, A., Beltrán, C. A., Kusunoki, M., Cotes, A. M., Motohashi, K., Kondo, T., & Deguchi, M. (2013). Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of general plant pathology*, 79(1), 74-85.
- Stocco, M. (2014). Control biológico de *Mycosphaerella graminicola*, patógeno del trigo, con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/42904>
- Zhang, S., Gan, Y. y Xu, B. (2016). Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Frontiers in plant science*, 7, 1405.
- Whipps y Budge (1990). A Method to Screen *Trichoderma* Isolates Against Soil Sclerotial Fungi and *Armillaria* Root Rot. *Biological Control of Plant Diseases* pp 427-430.
- Zin, N. A. y Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178.
- Zin, N. A. y Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178.

6. CONCLUSIÓN GENERAL

En la zona productora de berenjena del departamento de Córdoba, se encuentran cepas de *Trichoderma*, adaptadas a las condiciones edafológicas y al manejo agronómico del cultivo.

Un total de diez aislados de *Trichoderma* se identificaron de forma preliminar mediante observación morfológica, ocho de ellos lograron identificarse molecularmente.

La identificación basada en secuencias de ITS demostró que tres de las ocho de las cepas analizadas corresponden a *T. asperellum*, una de ellas a *T. lixii* y otra a *T. virens*.

Se logró evidenciar similitudes genéticas en las cepas de *Trichoderma* encontradas en el departamento de Córdoba, con cepas halladas en Países bajos, Alemania y China, reflejando de esta manera una alta diversidad genética.

En definitiva, las cepas *Trichoderma* spp. aisladas tienen capacidad biocontroladora *in vitro* sobre *S. rolsfii*; los tratamientos T001 (87,750%), T003 (87,750%) y T002 (80,500%), promueven la germinación de semillas y el crecimiento de plántulas en casa malla en la parte foliar (T005: *Trichoderma virens* y T008: *Trichoderma asperellum*).

Los tratamientos o cepas T003 (*Trichoderma* spp. no identificado) y T009 (*Trichoderma* sp.) pueden ser utilizadas en programas de manejo fitosanitario y nutricional de este cultivo, dada la respuesta favorable que presentaron sobre las variables del crecimiento y en las pruebas microparasíticas *in vitro*.