

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Evaluación *in vitro* de bioeficacia de tres aislamientos y un consorcio de *Trichoderma*
spp. sobre *Ralstonia solanacearum*

Proyecto de Titulación

Previo la obtención del Título de:

Magíster en Sanidad Vegetal

Presentado por:

Carlos Alfredo Armijos Nieto

Guayaquil - Ecuador

2025

Dedicatoria

El presente proyecto se lo dedico a:

Dios padre celestial por otorgarme bienestar y sabiduría en mi diario vivir; por permitirme gozar de salud y disfrutar la vida junto a mi familia.

La memoria de mi padre Carlos Alfredo por sus enseñanzas y amor incondicional.

La memoria de mi sobrina Maite del Cisne por su ternura e inocencia, que llenó mi vida de sentido y añorados recuerdos.

Mi madre Mónica Priscila por su amor inagotable e incondicional, pilar fundamental en el transcurso de mi vida y por la confianza puesta en mí y en mis sueños.

Mi hermana Melissa Nicole por ser guía y establecer un camino de superación, por su constante apoyo y amor fraterno.

Mi tío Ernesto Mauricio quien siempre ha brindado apoyo incondicional en el transcurso de mi vida académica y profesional.

Mi enamorada Angie Antonella y su familia Valverde Benítez por el cariño y aliento brindado durante la presente etapa académica.

Agradecimientos

Al término de la presente etapa como maestrante quiero agradecer a la Escuela Superior Politécnica del Litoral y a la Facultad de Ciencias de la Vida por la cálida acogida durante mi instancia académica.

Agradezco a todo el claustro docente de la Maestría en Sanidad Vegetal, que durante mi etapa académica brindaron enseñanzas y experiencias de campo laboral en beneficio de mi formación como profesional.

Mi más sincero agradecimiento al Ph.D, Freddy Arturo Magdama Tobar por ser guía y apoyo fundamental durante el transcurso de la investigación.

Agradecimiento a mis colegas, compañeros y amigos Anthony y Valeria, quienes brindaron apoyo fundamental en esta etapa académica.

Declaración Expresa

Yo **Carlos Alfredo Armijos Nieto** acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, agosto de 2025.

Carlos Alfredo Armijos Nieto

Evaluadores

Freddy Arturo Magdama Tobar

TUTOR

Email: frearmag@espol.edu.ec

Telf.: +593 988383477

Adriana Patricia Santos Ordoñez

PROFESOR DE MATERIA

Email: psantos@espol.edu.ec

Telf.: +593 980152711

Resumen

El cultivo de Banano particularmente en Ecuador se encuentra amenazado por la marchitez bacteriana o Moko bacteriano ocasionado por el complejo de bacterias *Ralstonia solanacearum* (Smith) raza 2 Filotipo 2, por lo cual la biotecnología agrícola investiga en los agentes de biocontrol debido a sus propiedades de antagonismo e inhibición del desarrollo de fitopatógenos. En vista de la relevancia del cultivo, se plantea la presente investigación con el objetivo de determinar el nivel de bioeficacia de cepas de *Trichoderma* spp. y la aplicación de metabolitos secundarios que se integren en el manejo de mitigación del complejo bacteriano *R. solanacearum*. La investigación se realizó en los laboratorios de CIBE, se estableció pruebas de desarrollo micelial, pruebas de inhibición *in vitro* en confrontación dual entre las cepas monospóricas aisladas de *Trichoderma*: Tcalan, Tca7 y Tsn y pruebas de inhibición *in vitro* de metabolitos secundarios extraídos de las cepas en mención frente al fitopatógeno. Los resultados identificaron a la cepa Tcalan con el más alto desarrollo micelial 29.3 mm, además de poseer la mayor capacidad inhibitoria *in vitro* el desarrollo de la bacteria con 58 % evaluado en 96 horas y cuyos metabolitos secundarios inhibieron al 100 % el desarrollo de la bacteria a nivel *in vitro*. Los datos obtenidos de las evaluaciones de inhibición de *R. solanacearum* contribuyen significativamente en la identificación del potencial de las cepas monospóricas y metabolitos secundarios excretados por *Trichoderma*, además de evidenciar las diferentes capacidades que posee cada aislado.

Palabras Clave: Inhibición, confrontación dual, metabolitos secundarios, fitopatógeno.

Abstract

Banana cultivation, particularly in Ecuador, is threatened by bacterial wilt or Moko disease, caused by the bacterial complex *Ralstonia solanacearum* (Smith) race 2, phylotype 2. For this reason, agricultural biotechnology is investigating biocontrol agents due to their antagonistic properties and their ability to inhibit the development of plant pathogens. Given the importance of this crop, the present research aims to determine the bioefficacy level of *Trichoderma* spp. strains and the application of secondary metabolites that can be integrated into the mitigation management of the *R. solanacearum* bacterial complex. The research was conducted in the CIBE laboratories, where tests were established for mycelial development, in vitro inhibition through dual confrontation between the isolated monosporic *Trichoderma* strains (Tcalan, Tca7, and Tsn), and in vitro inhibition tests of secondary metabolites extracted from these strains against the plant pathogen. The results identified the Tcalan strain as having the highest mycelial development 29.3 mm, in addition to possessing the greatest in vitro inhibitory capacity against bacterial development 58 % evaluated at 96 hours, and whose secondary metabolites inhibited 100% of bacterial development in vitro. The data obtained from the inhibition evaluations of *R. solanacearum* contribute significantly to identifying the potential of monosporic strains and secondary metabolites excreted by *Trichoderma*, in addition to demonstrating the different capacities of each isolate.

Keywords: Inhibition, dual confrontation, secondary metabolites, plant pathogen.

Índice General

Resumen.....	VI
Abstract	VII
Índice General	VIII
Índice de Tablas	XI
Índice de Figuras	XII
Capítulo 1	1
1.1. Introducción.....	2
1.2. Descripción del Problema.....	3
1.3. Justificación del Problema.....	4
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. Objetivo General	5
1.4.2. Objetivos Específicos	5
1.5. Marco Teórico.....	6
1.5.1. Trichoderma spp.....	6
1.5.2. Taxonomía de Trichoderma spp.	6
1.5.3. Morfología de Trichoderma spp.....	7
1.5.4. Condiciones de crecimiento de Trichoderma spp. en suelo	8
1.5.5. Condiciones de crecimiento de Trichoderma spp. in vitro.....	9
1.5.6. Metabolitos secundarios y antimicrobianos de Trichoderma.....	10

1.5.7. Mecanismos antagonistas y de biocontrol de <i>Trichoderma</i> spp.	11
1.5.8. <i>Ralstonia solanacearum</i>	11
1.5.9. Taxonomía de <i>Ralstonia solanacearum</i>	11
1.5.10. Morfología de <i>Ralstonia solanacearum</i>	12
1.5.11. Condiciones de crecimiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> en suelo	12
1.5.12. Condiciones de crecimiento de <i>Ralstonia solanacearum</i> in vitro.....	13
1.5.13. Metabolitos secundarios de resistencia de <i>Ralstonia solanacearum</i>	13
1.5.14. Competencia de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	15
Capítulo 2.....	16
2.1. Metodología.....	17
2.1.1. Evaluación del potencial de crecimiento de los aislados de <i>Trichoderma</i> en confrontaciones duales con <i>Ralstonia solanacearum</i>	17
Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	17
Aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i>	17
Confrontaciones duales entre los aislados de <i>Trichoderma</i> y <i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	18
Determinación del grado de actividad antagonista de los aislados de <i>Trichoderma</i> in vitro frente a <i>Ralstonia solanacearum</i>	18
2.1.2. Cuantificación de antagonismo de metabolitos antimicrobianos y enzimas líticas antagónicas de <i>Trichoderma</i> spp sobre <i>Ralstonia solanacearum</i>	19
Producción de metabolitos antimicrobianos y enzimas líticas.	19

Extracción de metabolitos antimicrobianos.	19
Pruebas de inhibición mediante metabolitos antimicrobianos <i>in vitro</i>	20
2.1.3. Análisis estadístico.....	20
Capítulo 3.....	21
3.1. Resultados y análisis.....	22
3.1.1. Aislamiento e identificación de las cepas de Trichoderma y Ralstonia ..	22
3.1.2. Crecimiento micelial de los aislados de Trichoderma.....	22
3.1.3. Capacidad de inhibición in vitro de aislados de Trichoderma spp. frente a Ralstonia solanacearum	25
3.1.4. Capacidad de inhibición in vitro de metabolitos antimicrobianos de Trichoderma spp. sobre Ralstonia solanacearum.....	28
Capítulo 4.....	32
4.1. Conclusiones.....	33
4.2. Recomendaciones	34
Referencias Bibliográficas	35

Índice de Tablas

Tabla 1 Taxonomía del género <i>Trichoderma</i> spp	6
Tabla 2 Taxonomía de <i>Ralstonia solanacearum</i>	11
Tabla 3 Identificación molecular de las cepas en estudio	21
Tabla 4 Medias de crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i>	22
Tabla 5 Análisis de varianza factorial de crecimiento micelial <i>invitro</i> de <i>Trichoderma</i>	24
Tabla 6 Medias de inhibición de crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Ralstonia solanacearum</i> medido en el tiempo	25
Tabla 7 Análisis de varianza factorial de inhibición de crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Ralstonia solanacearum</i>	27
Tabla 8 d Medias de inhibición <i>in vitro</i> de metabolitos antimicrobianos de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Ralstonia solanacearum</i> medido en el tiempo	28
Tabla 9 Análisis de varianza factorial de inhibición de crecimiento <i>in vitro</i> de metabolitos antimicrobianos de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Ralstonia solanacearum</i>	29

Índice de Figuras

Figura 1 Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de las cepas aislados de <i>Trichoderma</i>	21
Figura 2 Inhibición de crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Trichoderma</i> frente a <i>Ralstonia solanacearum</i>	24
Figura 3 Inhibición de crecimiento <i>in vitro</i> de metabolitos antimicrobianos de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Ralstonia solanacearum</i>	27

Capítulo 1

1.1. Introducción

La humanidad durante muchos años ha perseguido aumentar la disponibilidad de alimentos para disminuir la crisis de hambre a nivel global, ante lo cual un dato histórico acontece en la década de los sesenta al surgir el movimiento conocido como “revolución verde”, década en la que se consiguió aumentar los rendimientos de los cultivos agrícolas mediante la aplicación de agroquímicos tales como pesticidas, herbicidas, fertilizantes y maquinaria que hasta la actualidad su aplicación es constante (McArthur & McCord, 2017).

La agricultura convencional actualmente es menos sostenible debido que se encuentra bajo presión de aplicación de prácticas y manejos integrales, mercados exigentes diferenciados que obligan a cumplir esquemas de producción particulares; además en la actualidad los cultivos agrícolas en Ecuador presentan un creciente problema de plagas y enfermedades resistentes a los plaguicidas (González-León et al., 2020).

En la actualidad el cultivo de Banano particularmente en Ecuador se encuentra amenazado por fitopatógenos causantes de múltiples enfermedades, siendo una de las enfermedades más agresivas la marchitez bacteriana o Moko bacteriano ocasionado por el complejo de bacterias *Ralstonia solanacearum* (Smith) raza 2 Filotipo 2 (Genin & Denny, 2012); *R. solanacearum* es catalogada como la segunda bacteria fitopatógena más destructiva, ocasionando pérdidas de cultivo extremadamente altas y generando graves afectaciones económicas, esta enfermedad presenta una alta agresividad a tal magnitud que puede desaparecer el 100% de un cultivar (Álvarez et al., 2015)

La aplicación de pesticidas para el control de fitopatógenos es la práctica más recurrente, sin embargo, el constante uso desmesurado de estas moléculas químicas ha generado presión de selección y resistencia por parte del fitopatógeno. Debido a la problemática creciente ha surgido el interés de la biotecnología agrícola en la investigación

sobre productos biológicos plaguicidas como alternativas para la reducción y control de enfermedades. El control biológico está definido como la aplicación de ingredientes activos de organismos vivos, metabolitos primarios, secundarios o subproductos que antagonicen y detengan la proliferación de un patógeno o plaga; el principal objetivo de esta tecnología es reducir la afectación que ocasionan los fitopatógenos y plagas a las especies vegetales (Martínez, 2017).

La biotecnología agrícola dentro de sus líneas de estudio en los agentes de biocontrol se encuentra el género *Trichoderma*; este género de hongos es catalogado de suma importancia en los avances científicos debido a sus propiedades, múltiples funciones, producción de metabolitos y antimicrobianos de potencial biocontrol para combatir agentes patógenos en las especies vegetales (Zeilinger et al., 2016).

La aplicación de *Trichoderma* en los campos agrícolas, en sinergia con la agricultura sostenible permite generar una co-cultura en la que se utiliza estos agentes de control para reducir la afectación por plagas y agentes fitopatógenos, además de incrementar rendimientos debido que también poseen funciones de promotores de crecimiento vegetal (Poveda & Eugui, 2022).

Las principales funciones del género *Trichoderma* son producción de metabolitos secundarios, según lo mencionado por Díaz et al. (2025) este género es capaz de producir más de 100 compuestos tales como policétidos, pirona, terpenoides, esteroides, ácido isoharzianico (iso-HA), coningina; metabolitos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de enfermedades de plantas.

1.2.Descripción del Problema

El cultivo de banano en Ecuador se encuentra amenazado por fitopatógenos que afectan su desarrollo vegetativo y reproductivo. Problemática que afecta la productividad de

miles de hectáreas, considerando principalmente como limitantes de rendimiento a enfermedades fúngicas foliares como Sigatoka Negra (*Pseudocercospora fijiensis*) y al complejo de hongos del suelo causante de Marchitamiento (*Fusarium oxysporum*); patógenos considerados a nivel mundial como las enfermedades más severas.

Sin embargo, en la actualidad las bacterias fitopatógenas presentan un impacto significativo en la reducción de rendimiento y productividad a nivel mundial en el cultivo de banano. Un complejo bacteriano asociado a *Ralstonia solanacearum*, *R. syzyfii* subsp. *Celebesensis*, enfermedad conocida como Moko bacteriano están afectando el cultivo de musáceas en Ecuador, presenta una frecuencia cada vez mayor en diferentes localidades; lo que ha ocasionado pérdida de hectareaje productivo, reducción de rendimientos y aumento de costos de gestión del cultivo.

Las prácticas de gestión y manejo de bacteriosis en el cultivo de musáceas emplea biotecnología, ante lo cual el principal propósito de la presente investigación se fundamenta en evaluar e identificar cepas del género *Trichoderma* spp. con características antagónicas y de mitigación del complejo bacteriano *Ralstonia solanacearum*. El estudio de bioeficacia permite identificar cepas y aislados de microorganismos con características fisiológicas, metabólicas y bioquímicas fundamentales para ser masificados, de tal forma contribuir en los esfuerzos de reducción y control del patógeno. La utilización de estas cepas eficaces en complemento con un adecuado manejo integrado plantea la posibilidad de ejercer mitigación de la plaga.

1.3. Justificación del Problema

Ecuador es considerado a nivel global como líder en producción y exportación de cajas de banano, según lo mencionado por la Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador (2022) en el año 2022 de enero a noviembre se exportaron 234.42 millones de cajas

de banano; de la mencionada exportación aproximadamente el 26.67 % fue abarcado por países de la Unión Europea.

La exportación de banano en Ecuador representa 2 % del PIB y del PIB agrícola aproximadamente el 35 %. En vista de la relevancia del cultivo, se plantea la presente investigación con el objetivo de encontrar alternativas de mitigación del complejo bacteriano *Ralstonia solanacearum*. La aplicación de cepas bioeficaces, la capacidad metabólica y bioquímica de *Trichoderma* spp., podrán ser inoculados como agentes de control biológico.

Determinar el nivel de bioeficacia de cepas de *Trichoderma* spp., permite obtener organismos eficientes de biocontrol y contribuir en el manejo integrado de plagas; de igual manera promueve una producción agrícola sostenible.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Evaluar el potencial de antagonismo de los aislados de *Trichoderma* spp. frente al fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* en condiciones de laboratorio.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar el grado de actividad antagonista *in vitro* de tres aislados monospóricos de *Trichoderma* spp. frente a *Ralstonia solanacearum*, mediante ensayos de confrontación dual y evaluación de inhibición del crecimiento bacteriano.
- Cuantificar la inhibición de crecimiento mediante metabolitos antimicrobianos y enzimas líticas asociadas a la actividad antagonista de *Trichoderma* spp., con el fin de correlacionar su eficacia frente a *Ralstonia solanacearum*.

1.5. Marco Teórico

1.5.1. *Trichoderma* spp.

Trichoderma es un género de hongos filamentosos perteneciente a la familia Hypocreaceae. Este grupo es ampliamente conocido por su papel en los ecosistemas terrestres como descomponedores de materia orgánica y como agentes de control biológico en la agricultura. Su capacidad para producir metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas lo posiciona como un organismo clave en aplicaciones biotecnológicas (Harman et al., 2004).

"*Trichoderma in vitro*" se refiere al estudio y evaluación de las características fisiológicas, metabólicas, bioquímicas y de interacción de las especies de *Trichoderma* en condiciones de cultivo controladas en el laboratorio. Este enfoque permite analizar su capacidad para inhibir patógenos, adaptación, metabolismo y otros factores de interés agrícola y biotecnológico (Tyśkiewicz et al., 2022).

1.5.2. Taxonomía de *Trichoderma* spp.

En la Tabla 1 se presenta la taxonomía del género *Trichoderma* spp.

Tabla 1

Taxonomía del género Trichoderma spp.

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae

Género
Trichoderma

Entre las principales especies de *Trichoderma* estudiadas y evaluadas in vitro tenemos *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma atroviride*. Diversos estudios in vitro resaltan las propiedades antagonistas de estas especies frente a patógenos como resultados de confrontamientos duales (Druzhinina et al., 2011).

1.5.3. *Morfología de Trichoderma spp.*

El género “*Trichoderma*” se caracteriza por su rápido crecimiento y su distintiva coloración verdosa, la cual se debe a la producción abundante de conidios. En las etapas iniciales del desarrollo, el micelio suele ser blanco, pero conforme avanza la conidiación, adquiere tonalidades verdosas o amarillentas. Las colonias pueden presentar diferentes texturas, desde algodonosas hasta compactas (Sánchez Miranda et al., 2021).

A nivel microscópico, Siddiquee (2017) describe que la identificación de *Trichoderma* a nivel morfológico se basa en la observación de sus estructuras reproductivas, como conidióforos ramificados y fálides en verticilos. Estas estructuras permiten diferenciar especies, aunque hoy en día se complementan con técnicas moleculares para lograr mayor precisión en la clasificación.

Entre las especies más estudiadas se encuentran *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum* y *T. koningii*, cada una con variaciones en la forma y el tamaño de sus conidios, así como en su velocidad de crecimiento. Por ejemplo, *T. harzianum* suele desarrollar colonias compactas con una conidiación densa, mientras que *T. longibrachiatum* se distingue por sus conidios más alargados y su crecimiento menos compacto (Savín-Molina et al., 2021).

El color y la morfología de las colonias pueden variar entre especies y según el medio de cultivo utilizado. Se ejemplifica en medios como el Agar Papa Dextrosa (PDA), más de una cepa manifiestan tonalidades amarillo-verdosas o incluso azuladas a medida que envejecen. En ciertas especies, el reverso de la colonia puede presentar pigmentaciones amarillentas o marrones, mientras que en otras cepas restantes permanecen incoloras (Sánchez Miranda et al., 2021).

1.5.4. Condiciones de crecimiento de *Trichoderma* spp. en suelo

El género *Trichoderma* posee una rápida capacidad de colonización y una alta adaptabilidad en una amplia variedad de ambientes, especialmente en los que presentan una humedad relativa superior al 60% y sustratos ricos en materia orgánica. Sin embargo, puede tolerar periodos de sequía debido a la formación de esporas resistentes (Hjeljord & Tronsmo, 1998). Lo cual le permite competir eficientemente con microorganismos del entorno.

Entre las principales condiciones que favorecen el desarrollo de este hongo filamentoso, *Trichoderma* presenta una mayor tasa de crecimiento en temperaturas que oscilan entre 25 y 28°C, investigaciones científicas demuestran que el crecimiento in vitro de *Trichoderma* expuesto a temperaturas por encima o por debajo del rango se ralentizan o detienen (Gamarra et al., 2017).

Trichoderma tiene la capacidad de modificar el pH del entorno lo cual lo convierte en un microorganismo versátil para competir en diferentes tipos de ambientes naturales. Este hongo saprófito puede crecer en un rango amplio de pH (4-8) lo cual le permite desarrollarse en medios de cultivo artificiales como papa dextrosa agar (PDA) y extracto de malta (Schmoll et al., 2016).

1.5.5. Condiciones de crecimiento de *Trichoderma* spp. in vitro

El crecimiento in vitro de *Trichoderma* spp. está influenciado por diversos factores físico-químicos que afectan su desarrollo, esporulación y producción de metabolitos secundarios. Entre estos factores destacan la temperatura, el pH, la disponibilidad de nutrientes, la oxigenación y la humedad del medio de cultivo (Kumar et al., 2014; Mishra & Khan, 2015).

La temperatura óptima para el crecimiento de *Trichoderma* oscila entre 25 °C y 30 °C, aunque algunas especies pueden tolerar temperaturas superiores a los 35 °C o inferiores a los 20 °C. A temperaturas elevadas, el crecimiento puede verse inhibido, mientras que, en condiciones frías, la tasa de esporulación disminuye significativamente (Singh et al., 2014).

El pH del medio también desempeña un papel crucial en el desarrollo de *Trichoderma*. Se ha observado que un pH ligeramente ácido, entre 5 y 6.5 favorece su crecimiento y producción de enzimas hidrolíticas esenciales para la biocontrol de patógenos. Sin embargo, algunas especies pueden adaptarse a un rango más amplio de pH, dependiendo del tipo de sustrato y de la disponibilidad de nutrientes (Mishra & Khan, 2015).

Los nutrientes presentes en el medio de cultivo afectan directamente la biomasa y la esporulación de *Trichoderma*. Este hongo aprovecha fuentes de carbono como glucosa, sacarosa y celulosa para su metabolismo, mientras que el nitrógeno en forma de sales amoniacales o extractos de levadura contribuye a su crecimiento y producción de esporas. Además, oligoelementos como el hierro, el zinc y el magnesio son esenciales para su desarrollo óptimo (Kumar et al., 2014).

La aireación y el nivel de oxígeno son factores determinantes en cultivos líquidos, ya que *Trichoderma* es un hongo aeróbico que requiere oxígeno para su crecimiento. En fermentaciones sumergidas, una adecuada agitación y suministro de oxígeno pueden mejorar

la producción de biomasa y metabolitos secundarios, aumentando su efectividad en aplicaciones agrícolas (Singh et al., 2014).

Por último, la humedad del medio es fundamental para el desarrollo de *Trichoderma*. En cultivos en estado sólido, una humedad del 50-70 % es ideal para la formación de conidios y la colonización eficiente del sustrato. En medios líquidos, el control del contenido de agua y la evaporación es clave para evitar la inhibición del crecimiento (Mishra & Khan, 2015).

1.5.6. Metabolitos secundarios y antimicrobianos de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* es ampliamente reconocido por su capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Estos compuestos desempeñan un papel fundamental en la interacción del hongo con otros microorganismos, ya sea mediante la inhibición de patógenos o la promoción del crecimiento vegetal (Bae et al., 2015; Contreras-Cornejo et al., 2016).

Uno de los grupos más importantes de metabolitos secundarios son los piranoidenos, como la *trichodermin*, que tienen una notable actividad antifúngica. Este compuesto actúa inhibiendo la formación de membranas celulares en hongos patógenos, lo que contribuye a su efecto tóxico sobre varias especies de hongos fitopatógenos como *Fusarium* y *Verticillium*. La producción de estos compuestos le otorga a *Trichoderma* un papel crucial en el control biológico de enfermedades causadas por hongos patógenos (Asad, 2022).

El mecanismo de acción de estos metabolitos como los terpenoides, peptaiboles, gliotoxinas, pironas varía según el tipo de compuesto. Algunos afectan la integridad de la membrana celular de los patógenos, como los peptaiboles, mientras que otros inhiben procesos metabólicos clave, como la producción de enzimas esenciales para la supervivencia del patógeno (Anwar & Iqbal, 2017).

1.5.7. *Mecanismos antagonistas y de biocontrol de Trichoderma spp.*

Trichoderma es un hongo saprófito que genera compuestos bioactivos, como metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas, que afectan directamente a otros microorganismos, incluidos hongos y bacterias fitopatógenas.

Trichoderma produce antibióticos de forma natural como gliotoxina, trichodermina, viridina y peptaiboles. Metabolitos que actúan sobre las membranas celulares, sistemas enzimáticos y procesos metabólicos de los patógenos inhibiendo el crecimiento de microorganismos fúngicos y bacterianos (Mukherjee et al., 2013).

Además, tiene la capacidad de producir enzimas como celulasas, quitinasas y proteasas que descomponen paredes celulares de otros hongos y organismos patógenos (Kubicek et al., 2019).

1.5.8. *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum es una bacteria fitopatógena responsable de la marchitez bacteriana en una amplia variedad cultivos agrícolas, se caracteriza por presentar una alta tasa de contagio y su resiliencia ecológica especialmente en regiones tropicales y subtropicales donde condiciones de temperatura y humedad favorecen su desarrollo (Hayward, 1991).

1.5.9. *Taxonomía de Ralstonia solanacearum*

En la Tabla 2 se presenta la taxonomía de *Ralstonia solanacearum*.

Tabla 2

Taxonomía de Ralstonia solanaceearum

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria

Clase	Betaproteobacteria
Orden	Burkholderiales
Familia	Burkholderiaceae
Género	Ralstonia
Especie	<i>solanacearum</i>

La enfermedad denominada Moko bacteriano en particular es ocasionada por el patógeno *Ralstonia solanacearum* raza 2 biovar 1; los biovares difieren según su epidemiología, fisiología y distribución geográfica, mientras que las razas se agrupan según su rango de hospederos (Blomme et al., 2017).

1.5.10. Morfología de Ralstonia solanacearum

La bacteria *R. solanacearum* raza 2 biovar 1, es un bacilo gran negativo de 0.5-0.7 μm x 1.5-2.5 μm ; presenta alta motilidad y tiene de uno a cuatro flagelos lo cual influyen su alta movilidad; la variabilidad de los flagelos varía acorde al tipo de colonia (SENASICA, 2019).

El estudio propuesto por Saquicela et al. (2023) mencionan que las cepas más virulentas de *Ralstonia solanacearum* presentan características particulares, tales como cepas de crecimiento blanquecinas con centros rosados, bordes circulares, irregulares y mucoides; características destacadas de cepas virulentas.

1.5.11. Condiciones de crecimiento de Ralstonia solanacearum en suelo

La bacteria tiene capacidad de crecimiento en suelos con pH ligeramente ácidos, según lo mencionado por Saquicela et al. (2023) en un rango de 5 – 6.5; además de zonas lluviosas con promedios anuales de 2750 mm, la excesiva precipitación puede generar suelos ácidos ideales para el desarrollo de la bacteria.

Estudios propuestos por Li et al. (2017) menciona que los suelos con tendencia de ser ácidos aumentan significativamente la población de bacterias, específicamente *R. solanacearum*.

La temperatura promedio de desarrollo de la bacteria oscila los 28 °C según lo mencionado por Bhanwar (2022), mientras Bautista-Montealegre et al. (2016) estudió cultivos enfermos en temperaturas promedio de 8-17 °C y lo mencionado por SENASICA (2019) la temperatura promedio idónea para reproducción de *R. solanacearum* oscila los 30 °C

1.5.12. Condiciones de crecimiento de *Ralstonia solanacearum* in vitro

El crecimiento in vitro de *Ralstonia solanacearum* se ve influenciado por varios factores, incluyendo el tipo de medio de cultivo, la temperatura, y la disponibilidad de oxígeno. En condiciones de laboratorio, este patógeno se desarrolla óptimamente en medios de cultivo como Kelman, que favorecen la producción de exopolisacáridos, generando colonias viscosas y de bordes irregulares visibles en un periodo de 24 – 48 horas. Los medios Casamino Acid Peptone Glucose (CPG) y Triptona-Extracto de levadura-Glucosa (TYG) también se utilizan ampliamente para su cultivo debido a su capacidad para soportar el crecimiento bacteriano (Caruso et al., 2015; Fegan & Prior, 2005).

1.5.13. Metabolitos secundarios de resistencia de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum es una bacteria patógena que afecta a una amplia variedad de plantas, especialmente a aquellas del género *Solanum*. Esta bacteria se caracteriza por la producción de diversos metabolitos secundarios que contribuyen a su capacidad de colonizar y causar enfermedades. Entre los metabolitos más relevantes se encuentran los pigmentos, como la solanacina, que es una toxina producida por la bacteria. La solanacina no solo juega un papel en la virulencia de *Ralstonia*, sino que también tiene propiedades antibacterianas

que le permiten eliminar competidores en el entorno, favoreciendo su colonización (Schell et al., 2015). Este compuesto facilita la propagación de la bacteria al eliminar microorganismos competidores en el suelo o en la superficie de las plantas.

Otro metabolito importante son los exopolisacáridos (EPS), que *Ralstonia* sintetiza y secreta. Estos polisacáridos forman una capa protectora alrededor de las células bacterianas, lo que las hace más resistentes a los mecanismos de defensa de las plantas y a condiciones ambientales adversas, como la desecación o fluctuaciones de temperatura (Van den Mooter et al., 2018). Esta capa viscosa facilita la colonización de los tejidos vegetales, incrementando la virulencia del patógeno. Además, los exopolisacáridos contribuyen a la formación de biofilms, estructuras que protegen a las bacterias de los tratamientos antimicrobianos y del sistema inmunológico de la planta huésped.

Por otro lado, los ácidos grasos y otros lípidos también tienen un papel crucial en la resistencia de *Ralstonia*. Estos compuestos están involucrados en la formación y estabilidad de las membranas celulares, lo que ayuda a la bacteria a mantener su integridad frente a las condiciones desfavorables y los ataques de productos antimicrobianos (Feng et al., 2017).

Además de los metabolitos mencionados, *Ralstonia* produce factores de virulencia esenciales para su capacidad de causar enfermedad. Las proteínas secretadas a través del sistema de secreción tipo III (T3SS) son fundamentales en este proceso, ya que permiten a la bacteria manipular las respuestas inmunológicas de la planta y facilitar su invasión (Cunnac et al., 2009). Estas proteínas no solo contribuyen a la virulencia de la bacteria, sino que también la protegen de los mecanismos de defensa de la planta, aumentando su capacidad de infectar y proliferar dentro de los tejidos vegetales.

1.5.14. Competencia de *Trichoderma* spp. contra *Ralstonia solanacearum*

El control de *Ralstonia solanacearum*, representa un desafío en múltiples cultivos agrícolas. *Trichoderma* compite con esta bacteria a través de diversos mecanismos que incluyen la competencia por nutrientes, la modificación de condiciones del sustrato y la estimulación de la microbiota benéfica (Nieto-Jacobo et al., 2017).

Ralstonia solanacearum depende de nutrientes específicos como fuentes de carbono y nitrógeno para su proliferación, *Trichoderma* consume rápidamente estos recursos privando a *Ralstonia* del sustento necesario para su crecimiento.

Una investigación realizada por Konappa et al. (2018) demostró que cepas de *Trichoderma asperellum* inhibieron el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* en cultivos duales mediante la producción de compuestos antibióticos y competencia efectiva por espacio y nutrientes. La zona de inhibición alcanzó hasta 2 cm, destacando el potencial de este hongo como agente de biocontrol.

Capítulo 2

2.1. Metodología

La investigación se efectuó en los laboratorios del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), institución perteneciente a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

2.1.1. *Evaluación del potencial de crecimiento de los aislados de Trichoderma en confrontaciones duales con Ralstonia solanacearum*

Aislamiento de *Trichoderma*.

El aislamiento de *Trichoderma* se obtuvo de diferentes muestras de suelo de campos agrícolas bananeros y florícolas que recibieron presión de agroquímicos.

En laboratorio se utilizó el método mencionado por Alelign (2021) y Andrade et al. (2019), se colocó 10 gramos de suelo en cajas Petri con medio de cultivo PDA y se procedió a incubar en ausencia de luz a 25 ± 2 °C por dos días, posterior se retiró de la incubadora y se indujo la esporulación de *Trichoderma* bajo luz blanca por dos días; se tomó una porción del *Trichoderma* desarrollado y se transfirió a medio de cultivo PDA y se procedió a incubar a 25 ± 2 °C, procedimiento realizado hasta obtener crecimientos puros e identificar macroscópica y microscópicamente cada aislamiento además de conservar los aislados en agua estéril.

Aislamiento de *Ralstonia solanacearum*.

El cultivo bacteriano de *Ralstonia solanacearum* preservado e identificado se obtuvo de la Facultad de Ciencias de la Vida de la Escuela Superior Politécnica del Litoral. Se realizó un cultivo fresco de bacterias a partir del tubo CPG + Glicerol 20%, sacado del ultra congelador conservado a -80 °C. La reactivación se realizó mediante un pase en caja Petri con medio CPG, del cual se obtiene un volumen conocido y se procede a aplicar en una nueva caja Petri con medio CPG (Guo et al., 2021).

Confrontaciones duales entre los aislados de *Trichoderma* y *Ralstonia solanacearum*.

Los ensayos de confrontación dual se efectuaron en cajas Petri con cultivo Agar CPG libre de antibióticos, se realizó una suspensión de células bacterianas en solución salina al 0.85 % y se colocó 10 µL con concentración de 5×10^5 del aislado celular de *Ralstonia solanacearum* en cuatro puntos a 2.5 cm equidistante del centro y posterior se colocó un plot de 5 mm de *Trichoderma* en el centro de la caja Petri.

Se procedió a incubar a 28 ± 2 °C durante 96 horas, las confrontaciones duales entre el patógeno y el antagonista se evaluaron cada 24 horas, registro que permitió visualizar y evaluar el potencial de crecimiento de los aislados de *Trichoderma* sobre *Ralstonia solanacearum* (Pico Rosado et al., 2024).

Determinación del grado de actividad antagonista de los aislados de *Trichoderma* in vitro frente a *Ralstonia solanacearum*.

La determinación del crecimiento micelial para los aislados de *Trichoderma* se calculó mediante la fórmula:

$$PI = \frac{(MC - MT)}{MC} * 100$$

Dónde:

PI: porcentaje de inhibición de micelio

MC: diámetro de la colonia en control (mm)

MT: diámetro de la colonia en tratamiento (mm)

La medición cualitativa de capacidad antagónica se condicionó por el resultado obtenido de la fórmula de PI, descrito a continuación:

Muy alto (1): % > 75; Alto (2): % = 61-75; Moderado (3): % = 51-60; Bajo (4): % < 51 (Adamasu et al., 2023).

2.1.2. Cuantificación de antagonismo de metabolitos antimicrobianos y enzimas líticas antagónicas de *Trichoderma* spp sobre *Ralstonia solanacearum*.

Producción de metabolitos antimicrobianos y enzimas líticas.

La metodología propuesta por Harni et al. (2020) menciona que para la producción de metabolitos antimicrobianos se utilizó medios de cultivo de crecimiento fúngico y fermentativo PDB. La primera etapa consistió en la multiplicación del inóculo de *Trichoderma* spp., para obtener una población de los microorganismos de edad uniforme; de cada cepa en estudio para efectuar el procedimiento de fermentación.

Se utilizó 5 plots de 5 mm de cada inóculo de *Trichoderma* spp., obtenido de los márgenes de crecimiento activo de los recientes aislados cultivados en PDA, posterior se inoculó en matraces 500 ml cuyo contenido fue de 100 ml estéril de Caldo de Papa Dextrosa (PDB). Los medios líquidos fueron colocados en un agitador orbital durante 14 días a 25 ± 2 °C con agitación de 120 revoluciones por minuto (rpm).

Los caldos de cultivo se filtraron mediante técnica de doble filtrado con filtro de 22 µm filtrado obtenido se almacenó a ± 4 °C durante 24 horas previas a la extracción. (Stracquadanio et al., 2020).

Extracción de metabolitos antimicrobianos.

La extracción de los metabolitos secundarios a los filtrados correspondientes a *Trichoderma* spp. se efectuó mediante doble filtrado y una centrifugación intermedia a 4000

rpm durante 20 minutos entre cada filtrado. (Stracquadiano et al., 2020), posterior se procedió a medir los extractos concentrados de metabolitos secundarios y almacenarse a $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Pruebas de inhibición mediante metabolitos antimicrobianos *in vitro*.

Se realizó pruebas *in vitro* con los extractos crudos de metabolitos secundarios para inhibir el crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, mediante el método de difusión en pocillos en Agar CPG modificado. Los metabolitos antimicrobianos extraídos se mezclaron con Agar CPG en concentración al 50 %, posterior se vertió 15 ml de la mezcla preparada para cada tratamiento en cajas Petri de 9 cm de diámetro, una vez solidificado el medio se dispensó 10 μL con concentración de 5×10^5 del aislado celular de *Ralstonia solanacearum* en cuatro puntos a 2.5 cm equidistante del centro y se procedió a incubar $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas, se evaluó el crecimiento o inhibición de crecimiento cada 24 horas en comparación del tratamiento control sin metabolito secundario. El porcentaje de inhibición de los metabolitos antimicrobianos se observó midiendo los diámetros de las colonias en la caja Petri (Harni et al., 2020).

2.1.3. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completo aleatorizado (DCA) con 4 tratamientos y 4 repeticiones y se analizaron los datos mediante ANOVA y la comparación de medias mediante análisis Tukey con 99% de confiabilidad.

Capítulo 3

3.1. Resultados y análisis

3.1.1. Aislamiento e identificación de las cepas de *Trichoderma* y *Ralstonia*

Se obtuvieron tres aislados de cepas provenientes de un laboratorio privado, de acuerdo con un análisis de secuenciación molecular se identificaron como *Trichoderma asperellum*, tal como se observa en la Tabla 3.

La cepa identificada como *Ralstonia solanacearum*, proviene del Centro de Investigaciones Tecnológicas del Ecuador (CIBE); respaldada por su análisis molecular que asevera su identificación de género y especie, información presentada en la Tabla 3.

Tabla 3

Identificación molecular de las cepas en estudio

Código	Cepa	Accesión	Género y especie	Identidad (%)
Tcalan	<i>Trichoderma</i> spp.	HC814251	<i>Trichoderma asperellum</i>	99.83
Tca7	<i>Trichoderma</i> spp.		<i>Trichoderma asperellum</i>	100.0
Tsn	<i>Trichoderma</i> spp.		<i>Trichoderma asperellum</i>	99.19
RalstoniaCIBE	<i>Ralstonia</i> spp.	-	<i>Ralstonia solanacearum</i>	99.66

3.1.2. Crecimiento micelial de los aislados de *Trichoderma*

El crecimiento micelial permite identificar el potencial de antagonismo y desarrollo de las cepas en estudio, parámetro fundamental en las características deseadas de los microorganismos eficientes; puesto que se precisa sobreponerse al desarrollo y crecimiento de los fitopatógenos.

Las cepas aisladas de *Trichoderma*: Tcalan, Tca7 y Tsn, presentan un alto crecimiento micelial y son estadísticamente diferentes p-valor $2.2 \cdot 10^{-16}$ *** en cada etapa de tiempo 24, 48 y 72 horas evaluadas. La cepa Tcalan evidencia un mayor radio de desarrollo micelial con 6.1, 19.6 y 29.3 mm en el transcurso de las evaluaciones respectivamente, mientras la cepa Tsn

presenta el menor radio de desarrollo micelial 4.9 y 16.6 mm en las primeras 48 horas de evaluación. La importancia de evaluar crecimiento micelial de las cepas de *Trichoderma* en las primeras 72 horas observados en la Tabla 4, se enfoca en identificar una cepa promisorio que le permita sobreponerse al desarrollo de las células bacterianas de *Ralstonia solanacearum*.

Tabla 4

Medias de crecimiento micelial in vitro de Trichoderma

Código	Tiempo (horas)	Crecimiento micelial (mm)	p-valor
Tca7	24	5.5	0.00000**
Tcalan		6.1	
Tsn		4.9	
Testigo		0.0	
Tca7	48	17.9	0.00000**
Tcalan		19.6	
Tsn		16.6	
Testigo		00.0	
Tca7	72	25.6	0.00000***
Tcalan		29.3	
Tsn		26.0	
Testigo		00.0	

Nota. *** Altamente significativo

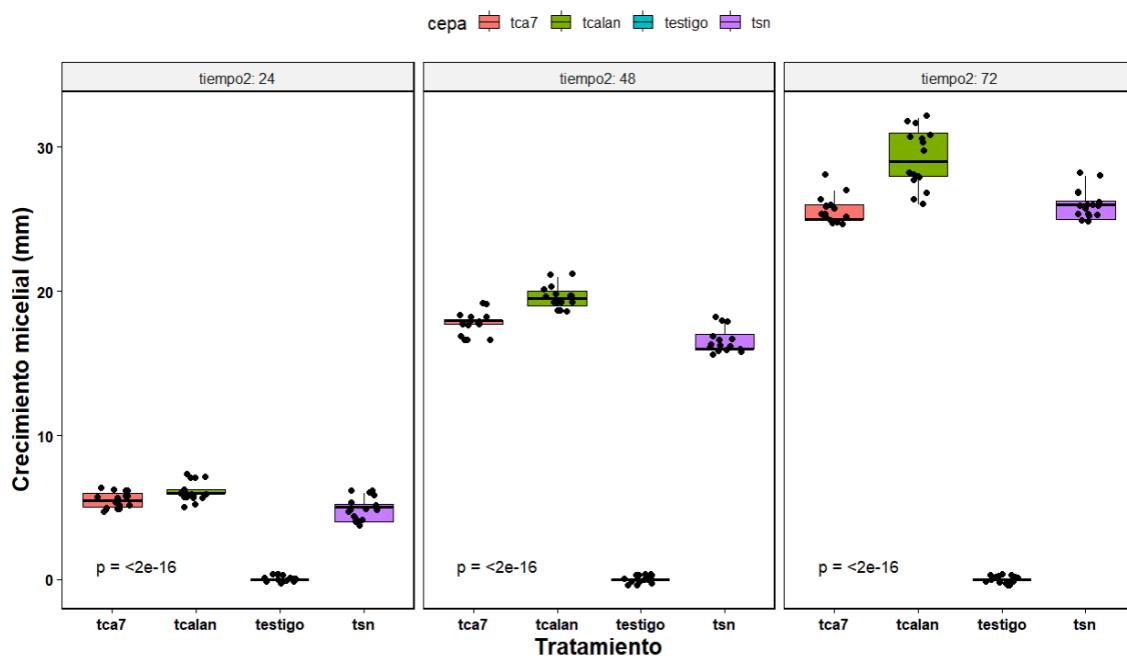
Las medias de crecimiento micelial *in vitro* presentados en la Figura 1, permite visualizar los radios de crecimiento de las cepas en estudio Tcalan, Tca7 y Tsn; los mayores radios de crecimiento se agrupan en la cepa Tcalan con un máximo de 35 mm de desarrollo en 72 horas, mientras las cepas Tca7 y Tsn desarrollaron un máximo de 30 mm en el mismo tiempo, radios de crecimiento semejantes a los obtenidos en el estudio de Rodríguez et al. (2020) con 39.3 mm de crecimiento micelial en el transcurso de 8 días.

Figura 1

Crecimiento micelial in vitro de las cepas aislados de Trichoderma

Crecimiento micelial de las cepas de Trichoderma

Evaluaciones realizadas cada 24 horas



Nota. Tiempo2 refiere a las horas en evaluación de las cepas de *Trichoderma*

Las medias de crecimiento radial de las cepas en estudio de *Trichoderma* presentan diferencias estadísticas significativas con p-valor $2.2 \cdot 10^{-16}$ ***, el aislado Tcalan presenta la media más alta de desarrollo 29.3 mm mientras el aislado Tca7 la menor media 25.6 mm, cabe destacar que el aislado Tcalan presenta una mayor miceliación, propiedad que le permitirá generar mayor inhibición por competencia de espacio y nutrientes a los fitopatógenos.

Tabla 5

Análisis de varianza factorial de crecimiento micelial in vitro de Trichoderma

Código	Crecimiento micelial (mm)	p-valor	Error
Tca7	25.6 ba	2.2 ⁻¹⁶ ***	1.2128
Tcalan	29.3 a		1.3963
Tsn	26.0 b		1.2666
Testigo	0.00 c		0.0000

Nota. Letras distintas en la misma columna significa diferencias significativas ($p < 0.01$). *** Altamente significativo

3.1.3. Capacidad de inhibición in vitro de aislados de *Trichoderma* spp. frente a *Ralstonia solanacearum*

La evaluación de inhibición de crecimiento de patógenos como indicador de microorganismos eficientes es de carácter fundamental en la biotecnología, debido a la necesidad de microorganismos benéficos con capacidades inhibitorias y antagonistas.

Los aislados de cepas monospóricas de *Trichoderma* presentaron diferencia porcentual significativa de su actividad *in vitro* antagonista e inhibitoria del fitopatógeno *Ralstonia solanacearum*.

Los valores de inhibición 0 % evaluados durante las primeras 48 horas presentados en la Tabla 6, se justifican por falta de interacción entre las cepas antagonistas y patógeno debido al crecimiento micelial y celular que se está efectuando en ese lapso de tiempo.

Tabla 6

Medias de inhibición de crecimiento in vitro de Trichoderma frente a Ralstonia solanacearum medido en el tiempo

Código	Tiempo (horas)	Inhibición (%)	p-valor
Tca7	48	00.0	0
Tcalan		00.0	
Tsn		00.0	
Testigo		00.0	
Tca7	72	19.0	0.00000***
Tcalan		26.0	
Tsn		18.0	
Testigo		00.0	
Tca7	96	47.0	0.00000***
Tcalan		58.0	
Tsn		49.0	
Testigo		00.0	

Nota. *** Altamente significativo

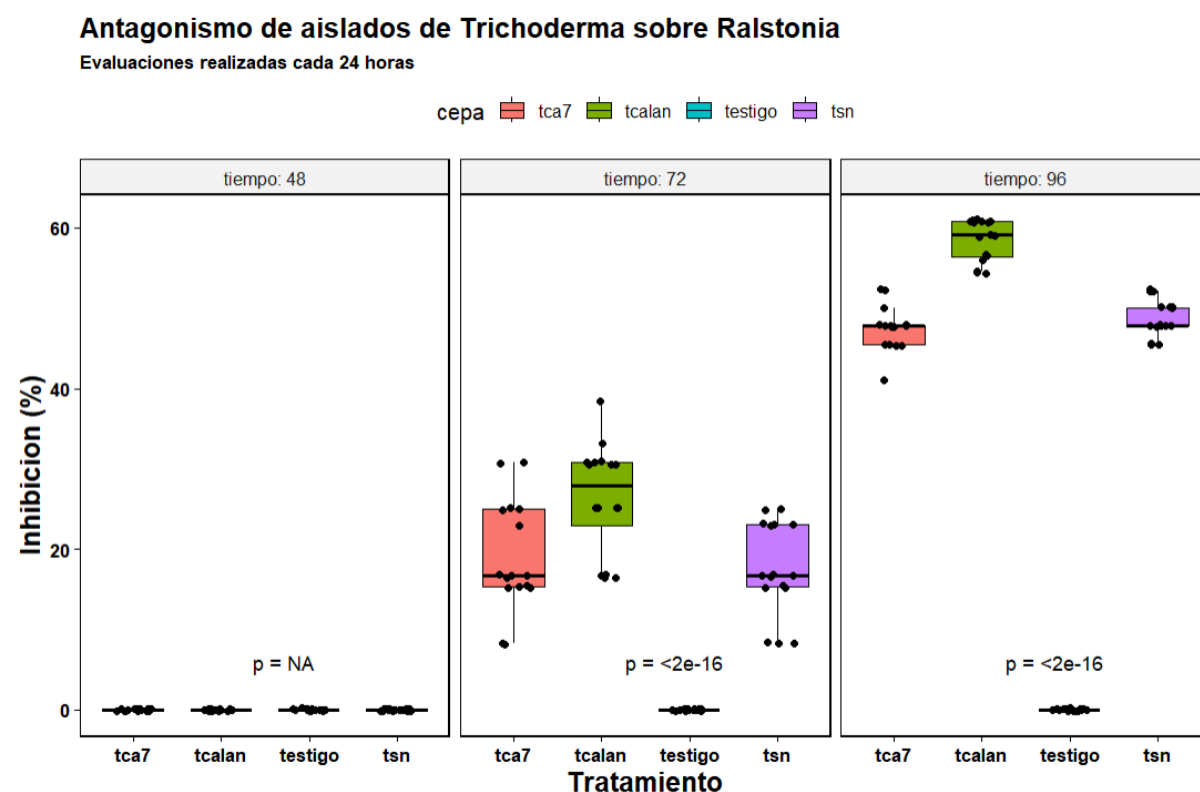
La confrontación dual permitió evidenciar el progreso de inhibición de cada cepa, en el transcurso del tiempo: 48, 72 y 96 horas en evaluación; se evidencia en la Tabla 6 mayor evolución de la capacidad inhibitoria a la cepa Tcalan con 26 % al tener interacción con el patógeno a las 72 horas y 58 % a las 96 horas; seguido de la cepa Tsn con 18 y 49 % evolutivamente en el tiempo, valores de inhibición semejantes a los obtenidos en el estudio realizado por Pico Rosado et al. (2024) con 57.73 % de inhibición en 6 días de evaluación.

La figura 2 presenta el aumento de inhibición de crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, obteniendo diferencias estadísticas altamente significativas p-valor 2.2^{-16} ***, ante lo cual la inoculación de las cepas de *Trichoderma*: Tcalan, Tca7, Tsn, permiten inhibir el crecimiento y antagonizar las células del fitopatógeno. Se ha determinado la importancia

de inocular cepas bioeficaces en el cultivo de banano, acción que permite mitigar la afectación de patógenos, inducir la resistencia, refuerzo a la inmunidad y obtener mejoras en los rendimientos agrícolas (Muthukathan et al., 2020).

Figura 2

Inhibición de crecimiento in vitro de Trichoderma frente a Ralstonia solanacearum



Nota. Tiempo refiere a las horas en evaluación de las cepas de *Trichoderma*

El análisis de varianza de las medias de inhibición se evidencia en la Tabla 7, se determinó la existencia de diferencias significativas en la variable Inhibición con p-valor 2.2×10^{-16} ***; además se comprobó mayor capacidad inhibitoria de la cepa Tcalan 58 % y una menor capacidad inhibitoria de la cepa Tca7 47 %, mientras las evaluaciones del Testigo no se evidencia inhibición al crecimiento de las células bacterianas, tal como menciona Rios-Velsaco et al. (2015) la eficacia de las cepas de *Trichoderma* spp. para inhibir el desarrollo de

fitopatógenos se determina por su alta tasa de competencia por espacio y nutrientes, parasitismo, producción de antimicrobianos e inactivación de las enzimas de los patógenos.

Tabla 7

Análisis de varianza factorial de inhibición de crecimiento in vitro de Trichoderma sobre Ralstonia solanacearum

Código	Inhibición (%)	p-valor	Error
Tca7	47.0 b	2.2 ⁻¹⁶ ***	2.8997
Tcalan	58.0 a		3.5393
Tsn	49.0 b		2.9842
Testigo	00.0 c		0.0000

Nota. Letras distintas en la misma columna significa diferencias significativas ($p < 0.01$). *** Altamente significativo

3.1.4. Capacidad de inhibición in vitro de metabolitos antimicrobianos de Trichoderma spp. sobre Ralstonia solanacearum

La evaluación de inhibición de crecimiento mediante los metabolitos antimicrobianos obtenidos de los aislados de *Trichoderma* presentados en la Tabla 8 y Figura 3, se evidencia una fuerte actividad antimicrobiana en la primera evaluación a las 24 horas de interacción con inhibición de 100 % en los metabolitos obtenidos de las cepas Tcalan y del Consorcio de metabolitos, mientras las cepas Tca7 y Tsn presentan 94.6 y 98.2 % de inhibición correspondientemente debido a un mínimo crecimiento de la bacteria, por su parte la evaluación del testigo tuvo desarrollo de las células bacterianas.

La evaluación realizada a las 48 horas determina en la cepa Tcalan alto potencial de metabolitos biológicamente activos y antimicrobianos al inhibir el 100 % de crecimiento de las células bacterianas, mientras los metabolitos de las cepas Tsn y Consorcio una inhibición de 81.7 y 84.7 % presentan reducción en el crecimiento de las células bacterianas y los

metabolitos de la cepa Tca7 con 61.5 % de inhibición posee menor actividad antibacteriana; datos semejantes a los propuestos en el estudio de Yan & Khan (2021), con el mayor halo de inhibición de 20 mm mediante la fuerte actividad antibacterial de los metabolitos extraídos de *Trichoderma* spp. frente a *R. solanacearum*.

Tabla 8

Medias de inhibición in vitro de metabolitos antimicrobianos de Trichoderma sobre Ralstonia solanacearum medido en el tiempo

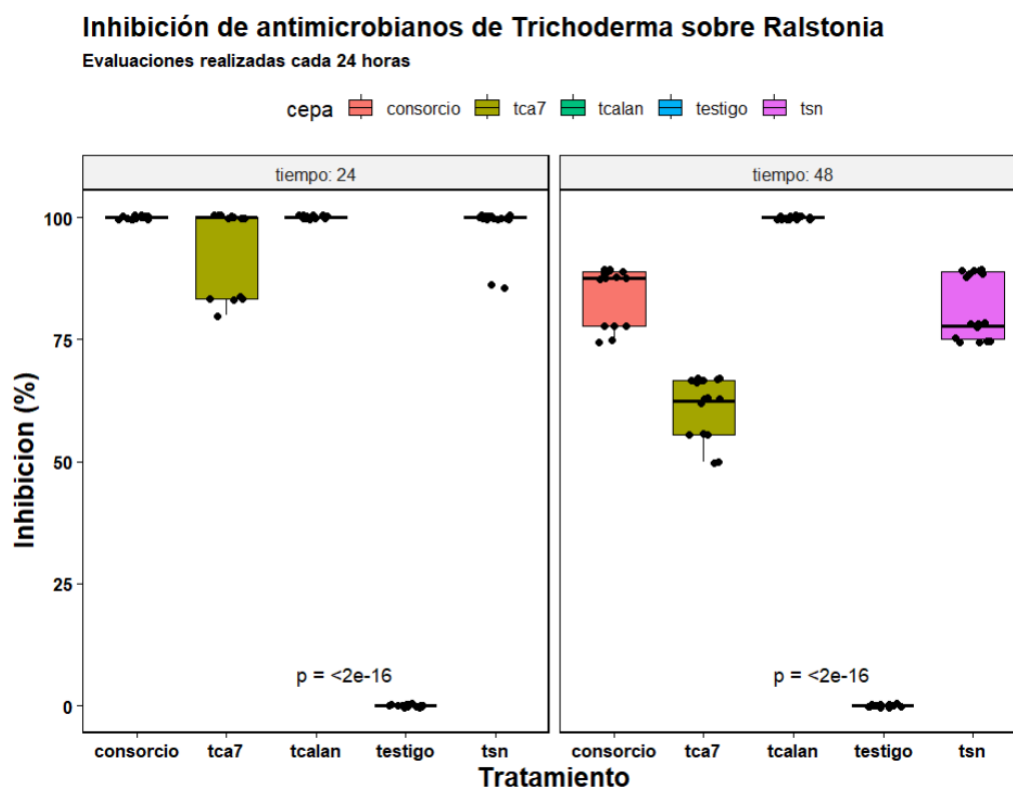
Código	Tiempo (horas)	Inhibición (%)	p-valor
Tca7	24	94.6	0.00000***
Tcalan		100.0	
Tsn		98.2	
Consorcio		100.0	
Testigo		00.0	
Tca7	48	61.5	0.00000***
Tcalan		100.0	
Tsn		81.7	
Consorcio		84.7	
Testigo		00.0	

Nota. *** Altamente significativo

La Figura 3 y la Tabla 9 presentan los datos generales de inhibición mediante los metabolitos antimicrobianos segregados por las cepas de *Trichoderma*, se evidencia diferencias estadísticas significativas en cada periodo de evaluación p-valor 2.2^{-16} ***, la cepa Tcalan acumula todos los datos observados con 100 % de inhibición, los antimicrobianos de las cepas Tsn y el Consorcio son estadísticamente iguales con 81.7 y 84.7 % de inhibición, mientras la cepa Tca7 presenta ligera variación en inhibición con un mínimo de 50 % y estadísticamente diferente a lo evaluado.

Figura 3

Inhibición de crecimiento in vitro de metabolitos antimicrobianos de Trichoderma sobre Ralstonia solanacearum



Nota. Tiempo refiere a las horas en evaluación de las cepas de *Trichoderma*

Tabla 9

Análisis de varianza factorial de inhibición de crecimiento in vitro de metabolitos antimicrobianos de Trichoderma sobre Ralstonia solanacearum

Código	Inhibición (%)	p-valor	Error
Tca7	61.5 c	2.2 ⁻¹⁶ ***	3.2349
Tcalan	100.0 a		0.0000
Tsn	81.7 b		1.7884
Consortio	84.7 b		1.5402
Testigo	00.0 d		1.5204

Nota. Letras distintas en la misma columna significa diferencias significativas ($p < 0.01$). *** Altamente significativo

Los datos de crecimiento de las células bacterianas generados por el testigo evidencian la eficacia de aplicar compuestos antimicrobianos biológicamente activos segregados por *Trichoderma* en mitigación de fitopatógenos, aseverando lo informado en el estudio de Guo et al. (2021) los metabolitos tales como peptaibol, tricoconina VI, viridifungina, trichodin A, entre otros compuestos bioactivos generan supresión en el crecimiento bacteriano, además destaca que cada cepa aislada de *Trichoderma* tiene la capacidad de generar diferentes compuestos antimicrobianos y metabolitos secundarios.

Capítulo 4

4.1. Conclusiones

La presente investigación permitió la identificación y evaluación exhaustiva de las cepas aisladas de *Trichoderma*, caracterización fundamental para comprender las diferentes capacidades de control e inhibición de crecimiento de células bacterianas.

Se evidenció el mayor desarrollo micelial proveniente de la cepa Tcalan con 29.3 mm en 72 horas evaluadas, además la más alta actividad antimicrobiana con media de 58 % de inhibición *in vitro* en confrontación dual frente a *R. solanacearum*.

La actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios y compuestos bioactivos extraídos de la cepa Tcalan evidenciaron eficacia del 100 % de inhibición *in vitro* de *R. solanacearum*, hallazgos que proponen que estos compuestos bioactivos desempeñarán un papel fundamental en el control y mitigación de fitopatógenos.

Los datos obtenidos de las evaluaciones de inhibición de *R. solanacearum* contribuyen significativamente en la identificación del potencial de las cepas monospóricas y metabolitos secundarios excretados por *Trichoderma*, además de evidenciar las diferentes capacidades que posee cada aislado.

4.2. Recomendaciones

Las evaluaciones de inhibición del presente proyecto, demostraron el potencial antagonista de las cepas monospóricas ergo es preciso se realice un estudio metabolómico que permita identificar y caracterizar los compuestos y moléculas.

La aplicación en mezcla de metabolitos secundarios e inoculación de esporas en diferentes concentraciones, para determinar el sinergismo y aumentar la inhibición a fitopatógenos.

Referencias Bibliográficas

- Admasu, W., Sintayehu, A., Gezahgne, A., & Terefework, Z. (2023). In vitro bioefficacy of *Trichoderma* species against two *Botryosphaeriaceae* fungi causing Eucalyptus stem canker disease in Ethiopia. *Journal of Natural Pesticide Research*, 4, <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100037>.
- Alelign, S. (2021). Evaluation of the efficacy of *Trichoderma* and *Pseudomonas* species against bacterial wilt *Ralstonia* isolates of tomato (*Lycopersicum* species). *African Journal of Microbiology Research*. <https://doi.org/10.5897/AJMR2021.9523>
- Álvarez, E., Pantoja, A., Gañan, L., y Ceballos, G. (2015). *Current status of Moko disease and black sigatoka in Latin America and the Caribbean, and options for managing them*. Publicación CIAT No 404. Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT]; Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/CURRENT_STATUS_OF_MOKO_DISEASE_AND_BLACK_SIGATOKA_IN_LAC_AND_OPTIONS_FOR_MANAGING_THEM_final.pdf
- An, Y., & Zhang, M. (2024). Advances in understanding the plant-*Ralstonia solanacearum* interactions: Unraveling the dynamics, mechanisms, and implications for crop disease resistance. *Plant Science*, 315, 111120. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2024.111120>
- Andrade Hoyos, P., Luna Cruz, A., Osorio Hernández, E., Molina Gayosso, E., Landero Valenzuela, N., & Barrales Cureño, H. J. (2019). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1259–1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>

- Anwar, J., & Iqbal, Z. (2017). Effect of growth conditions on antibacterial activity of *Trichoderma harzianum* against selected pathogenic bacteria. *Sarhad Journal of Agriculture*, 33(4), 501-510. <https://doi.org/10.17582/journal.sja/2017/33.4.501.510>
- Asad, S. A. (2022). Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases – A review. *Ecological Complexity*, 49, 100978. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2022.100978>
- Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador. (2022). Oferta de banano en Unión Europea y Reino Unido. Importación de cajas de banano entre enero y septiembre.
- Bae, S.-J., Mohanta, T. K., Chung, J. Y., Ryu, M., Park, G., Shim, S., Hong, S.-B., Seo, H., Bae, D.-W., Bae, I., & Kim, J.-J. (2015). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control*, 92(3), 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>
- Balakrishnan, S., Seethapathy, P., Kamalakannan, A., & Kuppasamy, S. (2017). Evaluation of antagonistic activity and plant growth promotion by paste formulation of *Trichoderma harzianum*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(11), 1373-1384. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1360197>
- Bautista-Montealegre, L. G., Bolaños-Benavides, M. M., Abuanza-González, C. A., Argüelles-Cárdenas, J. H., y Forero-Camacho, C. A. (2016). Moko del plátano y su relación con sus propiedades físicas y químicas en suelos del departamento de Quindío, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10(2), 273-283. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5066>
- Bhanwar, R. (2022). Effect of temperature and pH level on growth of bacterial wilt causing *R. solanacearum* under in vitro condition. *The Pharma Innovation Journal*, 11(1), 1656-

1659. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2022/vol11issue1/PartW/11-1-168-631.pdf>

Blomme, G., M. Dita, K. Jacobsen, L. Perez Vicente, A. Molina, W. Ocimati, S. Poussier & P. Prior. (2017). Bacterial diseases of bananas and enset: Current state of knowledge and integrated approaches toward sustainable management. *Front Plant Sci.* 8:1290. DOI: 10.3389/fpls.2017.01290.

Bocsanczy, A. M., Achenbach, U. C., Mangravita-Novo, A., et al. (2014). Proteomic comparison of *Ralstonia solanacearum* strains reveals temperature dependent virulence factors. *BMC Genomics*, 15, 280. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-280>

Caruso, P., Biosca, E. G., Bertolini, E., Marco-Noales, E., Gorris, M. T., Licciardello, C., & López, M. M. (2015). Genetic diversity reflects geographical origin of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from plant and water sources in Spain. *Microbiología*, 31(3), 298-309. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.298>

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., & Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: Interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(4), fiw036. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw036>

Cunnac, S., Boucher, C., & Poussier, S. (2009). The plant pathogen *Ralstonia solanacearum*: Insights into its biology, diversity, and host specificity. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 503-509. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.010>

Díaz de la Osa, A., Almenares Casanova, M., Fernández Millares, B., Aguado Casas, M. E., Rojas, L., Zeilinger, S., & Hernández-Rodríguez, A. (2025). Secondary metabolites and extracellular proteases contribute to the antagonistic action of

indigenous *Trichoderma* strains against *Botrytis cinerea*. *Fungal Biology*, 129(1), 101530.

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., & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), 749-759. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2637>

Fegan, M., & Prior, P. (2005). How and why the *Ralstonia solanacearum* species complex is an important plant pathogen. In: G. M. L. K. A. J. (Ed.), *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* (pp. 1–14). Springer. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1009>

Feng, J., Chen, Q., & Cheng, Z. (2017). The role of lipids in the virulence of *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1307-1317. <https://doi.org/10.1111/jam.13351>

Gamarra, M. A. F., Ojeda, M. M., & Maldonado, G. A. E. (2017). Molecular identification and growth rate of native strains of *Trichoderma* spp. isolated from the Northern Region of Paraguay. *Investigación Agraria*, 19(2), 127-132. <https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2017.diciembre.127-132>

Genin, S., & Denny, T. P. (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annual Review of Phytopathology*, 50, 67–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173000>

González-León, Y., Anducho-Reyes, M. A., Cartagena-Luna, A. & Mercado-Flores, Y. (2020). Capítulo 10. Agricultura sostenible: herramienta para la soberanía alimentaria. En: Marroquín, J. A., Olivares-Ramírez, J. M., Cruz-Carpio, L. E. & Bautista-

- Jiménez, A. (Eds). *Mujeres en la Ciencia, Handbooks T-VIII*. (pp. 142-152). México: ECORFAN Mexico, S.C. <http://doi.org/10.35429/H.2020.8.142.153>
- Guo, Y., Fan, Z., Yi, X., Zhang, Y., Khan, R. A. A., & Zhou, Z. (2021). Sustainable Management of Soil-Borne Bacterium *Ralstonia solanacearum* In Vitro and In Vivo through Fungal Metabolites of Different *Trichoderma* spp. *Sustainability: Science Practice and Policy*, 13(3), 1491. <https://doi.org/10.3390/su13031491>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Harni, R., Amaria, W., & Mahsunah, A. H. (2020). Effect of secondary metabolites of *Trichoderma* spp. in inhibiting *Phytophthora palmivora* growth in cacao (*Theobroma cacao* L.). *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science*, 468(1), 012049. doi: 10.1088/1755-1315/468/1/012049
- Hayward, A. C. (1991). Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annual Review Of Phytopathology*, 29(1), 65-87. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>
- Hjeljord, L., & Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma and Gliocladium in biological control: an overview*. In Harman, G.E., & Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium. Vol. 2: Enzymes, biological control and commercial applications*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1201/9781482267945>
- Konappa, N., Krishnamurthy, S., Siddaiah, C. N., Ramachandrappa, N. S., & Chowdappa, S. (2018). Evaluation of biological efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Egyptian Journal Of Biological Pest Control*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0069-5>

- Kubicek, C. P., Steindorff, A. S., Chenthamara, K., Manganiello, G., Henrissat, B., Zhang, J., Cai, F., Kopchinskiy, A. G., Kubicek, E. M., Kuo, A., Baroncelli, R., Sarrocco, S., Noronha, E. F., Vannacci, G., Shen, Q., Grigoriev, I. V., & Druzhinina, I. S. (2019). Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma* species. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5680-7>
- Li, S., Liu, Y., Wang, J., Yang, L., Zhang, S., Xu, C., y Ding, W. (2017). Soil Acidification Aggravates the Occurrence of Bacterial Wilt in South China. *Frontiers in Microbiology*, 8(1), 703-712. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00703>
- Li, Tingting & Tang, Jiaquan & Valliappan, Karuppiiah & Li, Yaqian & Xu, Nan & Chen, Jie. (2019). Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. *Biological Control*. 140. 104122. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104122>.
- McArthur, J. W. & McCord, G. C. (2017), Fertilizing growth: Agricultural inputs and their effects in economic development. *Journal of Development Economics*, 127, 133–152. <http://doi.org/10.1016/j.jdeveco.2017.02.007>
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annual Review Of Phytopathology*, 51(1), 105-129. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- Muthukathan, G., Mukherjee, P., Salaskar, D., Pachauri, S., Tak, H., Ganapathi, T. R., & Mukherjee, P. K. (2020). Secretome of *Trichoderma virens* induced by banana roots - identification of novel fungal proteins for enhancing plant defence. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 110(101476), <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101476>

- Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., De Souza, J. T., Jimenez-Bremont, J. F., Ohkura, M., Stewart, A., & Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Frontiers In Plant Science*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>
- Pico Rosado, J., Suárez Palacios, C., Jiménez Cumbicus, J., Paredes Puga, E., Sabando, G., & Andrade Olalla, L. (2024). In vitro evaluation of the inhibitory capacity of three *Trichoderma* isolates on *Ralstonia solanacearum*. *Bionatura*, 9(1), 1–9.
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2024.09.01.6>
- Poveda Jorge & Eugui Daniel (2020). Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture. *Biological Control*, 176, 105100.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105100>
- Prior, P., & Fegan, M. (2005). RECENT DEVELOPMENTS IN THE PHYLOGENY AND CLASSIFICATION OF *RALSTONIA SOLANACEARUM*. *Acta Horticulturae*, 695, 127-136. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.695.14>
- Rodríguez García, D., & Wang Wong, A. (2020). Efectividad a nivel in vitro de *Trichoderma* spp. nativos e importados contra *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Costarricense*. <https://doi.org/10.15517/rac.v44i2.43096>
- Sánchez Miranda, M. D., Moreno Mayorga, L. F., & Páramo Aguilera, L. A. (2021). Identificación morfológica y molecular de especies autóctonas *Trichoderma* spp., aisladas de suelos de importancia agrícola. *EL HIGO*, 11(01), 26-42.
<https://doi.org/10.5377/elhigo.v11i1.11715>

Saquicela Cruz, P. S. ., Romanova, E. V. ., Guamán Guamán, R. N., Ulloa Cortázar, S.

M. ., & Villavicencio Abril, Ángel F. . (2023). Caracterización morfológica y bioquímica de *Ralstonia solanacearum* Raza 2, bacteria patógena en cultivos de banano y plátano en El Carmen, Manabí, Ecuador. *Siembra*, 10(1), e4305.
<https://doi.org/10.29166/siembra.v10i1.4305>

Savín-Molina, J., Hernández-Montiel, L. G., Ceiro-Catasú, W., Ávila-Quezada, G. D., Palacios-Espinosa, A., Ruiz-Espinoza, F. H., & Romero-Bastidas, M. (2021). 1 Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos del semiárido. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39(3), 435-453.
2 <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-7>

Schell, M. A., & Smalla, K. (2015). The role of secondary metabolites in the resistance of *Ralstonia solanacearum* to environmental stresses. *Journal of Plant Pathology*, 97(4), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s42161-015-0051-7>

Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M. I., Baker, S. E., Brown, C., Cervantes-Badillo, M. G., Cetz-Chel, J., Cristobal-Mondragon, G. R., Delaye, L., Esquivel-Naranjo, E. U., Frischmann, A., De Jesus Gallardo-Negrete, J., García-Esquivel, M., Gomez-Rodriguez, E. Y., Greenwood, D. R., Hernández-Oñate, M., . . . Herrera-Estrella, A. (2016). The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 80(1), 205-327. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00040-15>

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA].

(2019). *Moko del plátano. Ralstonia solanacearum* raza 2. Ficha Técnica No. 03.
Dirección General de Sanidad

Vegetal. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/Fichas%20tecnicas/Ficha%20T%C3%A9cnica%20de%20Moko%20del%20platano.pdf>

Siddiquee, S. (2017). *Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of Trichoderma Species from Tropical Regions*. Springer Cham.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7>

Sinha, B., Haldhar, S. M., Sarangi, P. K., Chakrapani, K., Mishra, L. K., Sandhya, R. P., Tampakleima, W., Konjengbam, R., Th, B., & Ralte, Z. (2024). Trichoderma role as an essential plant growth promotion-a review. *Journal Of Agriculture And Ecology*, 19, 1-25. <https://doi.org/10.58628/jae-2419-201>

Stracquadanio, C., Quiles, J. M., Meca, G., & Cacciola, S. O. (2020). Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by and in Liquid Medium. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/jof6040263>

Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ścisiel, J. (2022). Trichoderma: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>

Van den Mooter, M., Haring, M. A., & Bakker, P. A. (2018). Exopolysaccharides and their role in the virulence of plant pathogens. *Phytopathology*, 108(5), 520-533.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-18-0021-R>

Wang, Z., Luo, W., Cheng, S., Zhang, H., Zong, J., & Zhang, Z. (2023). *Ralstonia solanacearum* – A soil borne hidden enemy of plants: Research development in management strategies, their action mechanism and challenges. *Frontiers In Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1141902>

Yan, L., & Khan, R. A. A. (2021). Biological control of bacterial wilt in tomato through the metabolites produced by the biocontrol fungus, *Trichoderma harzianum*.

Egyptian Journal of Biological Pest Control, 31(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1186/s41938-020-00351-9>

Zeilinger S, Gruber S, Bansal R, Mukherjee PK. 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma*-Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, 30(2): 74-90.

doi:10.1016/j.fbr.2016.05.001