

Actividad antagónica *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* contra *Botrytis* sp

In vitro antagonistic activity of native *Trichoderma* strains against *Botrytis* sp

Cristian Schmelink Ramos Monterrosa^a; María Cristina Roza Flórez^a; Angela Maritza Cajiao Pedraza^a; Ramón Ovidio García-Rico^a; Gladys Montañez Acevedo^b

^a Grupo de investigación en microbiología y biotecnología, Universidad de Pamplona, Colombia.; mail: cristian.ramos@unipamplona.edu.co

^a Grupo de investigación en microbiología y biotecnología, Universidad de Pamplona, Colombia.; mail: maria.roza@unipamplona.edu.co

^a Grupo de investigación en microbiología y biotecnología, Universidad de Pamplona, Colombia.; mail: angelacajiao@unipamplona.edu.co

^a Grupo de investigación en microbiología y biotecnología, Universidad de Pamplona, Colombia.; mail: ovidio.garcia@unipamplona.edu.co

^b Grupo de investigación en Recursos Naturales, Universidad de Pamplona, Colombia.; mail: gmontaneza@gmail.com

Corresponding author: Cristian.ramos@unipamplona.edu.co

Submitted: 29-03, 2025. Accepted: 24-05, 2025.

Resumen

Botrytis cinerea es un importante fitopatógeno que afecta una enorme variedad de plantas, siendo el responsable de graves pérdidas económicas en más de 200 especies de cultivos en todo el mundo. Aunque el uso de fungicidas es la estrategia más usada para su control, la plasticidad genética de este hongo le permite desarrollar resistencia. Por tanto, el control biológico ha ganado terreno como un enfoque alternativo o complementario a los fungicidas. A este respecto, *Trichoderma* es el género más estudiado y con mayor potencial como controlador biológico. Por tanto, la búsqueda y estudio de cepas nativas de *Trichoderma* con potencial biocontrolador es una línea de interés para el sector agrícola local y regional. En este trabajo se reporta el estudio *in vitro* de la capacidad biocontroladora de un producto comercial, en comparación con el potencial antagonista de dos cepas autóctonas aisladas de suelos de zonas agrícolas de los municipios de Pamplona (TN01) y Bucarasica (TN02), en Norte de Santander. La caracterización morfológica determinó que ambas cepas se ubican taxonómicamente en el clado *Viride* del género *Trichoderma*. Mediante la técnica de cultivo dual se determinó la velocidad de crecimiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los antagonistas. Los resultados indicaron que la cepa con mayor potencial para ser usada como controlador biológico de *Botrytis* spp., fue TN01. Esta cepa mostró la mayor velocidad de crecimiento apical y consiguió un PICR del 80% al final del experimento, superando lo conseguido por el producto comercial de referencia. Por su parte, la cepa TN02 mostró una menor capacidad antagónica con un PICR de 55% después de 12 días. Lo anterior sugiere el uso de la cepa autóctona *Trichoderma* TN01 para ser ensayada en condiciones de cultivo.

Palabras clave: Control biológico; fitopatógeno; agroquímicos, moho gris.

Abstract

Botrytis cinerea is a major plant pathogen that affects a wide range of plants and is responsible for severe economic losses in more than 200 crops worldwide. Although the use of fungicides is the most common strategy for its control, the genetic plasticity of this fungus allows it to develop resistance. Consequently, biological control has gained ground as an alternative or complementary approach to fungicides. In this regard, *Trichoderma* is the most studied genus with the greatest potential as a biological control agent. Therefore, the search and study of native *Trichoderma* strains with biocontrol potential is a line of interest for the local and regional agricultural sector. This study reports the *in vitro* investigation of the biocontrol capacity of a commercial product, in comparison with the antagonistic power of two native strains isolated from soils in the agricultural areas of the municipalities of Pamplona (TN01) and Bucarasica (TN02), in Norte de Santander. Morphological characterisation determined that both strains are taxonomically located in the *Viride* clade of the genus *Trichoderma*. The growth rate and the percentage of radial growth inhibition (PICR) of the antagonists were determined using the dual culture technique. The results indicated that TN01 was the strain with the highest potential to be used as a biological controller of *Botrytis* spp. This strain showed the highest apical growth rate and achieved a PICR of 80% at the end of the experiment, exceeding that achieved by the commercial reference product. Conversely, strain TN02 exhibited a diminished antagonistic capacity, with a PICR of 55% after a 12-day period. This observation suggests the potential for the autochthonous strain TN01 to be evaluated under cultivation conditions.

Keywords: Biological control; phytopathogen; agrochemicals, grey mould.

1. Introducción

Botrytis cinerea (teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*) es uno de los hongos fitopatógenos más importantes del planeta, ya que puede atacar a numerosas plantas hospedantes, incluidas una amplia variedad de especies de gran importancia económica [4]. Por ejemplo, debido a su alta frecuencia y elevado grado de afectación sobre los frutos, es el patógeno más importante y que ocasiona las mayores pérdidas económicas en la industria de la fresa [10],[25],[30]. En Colombia es uno de los fitopatógenos más ubicuos y de mayor importancia, siendo capaz de afectar la producción de cultivos tan diversos como la rosa o la mora de castilla [15].

En las condiciones actuales de producción agrícola, el uso de fungicidas es la práctica predominante para proteger los cultivos. En el caso de la fresa, se estima que, en las condiciones idóneas para el desarrollo del hongo, más del 80% de las flores y los frutos de la fresa pueden afectarse si las plantas no han sido tratadas con agroquímicos. Lo anterior ha llevado a que los agricultores, muchas veces sin asesoría técnica, usen de manera indiscriminada fungicidas, con las consecuencias que ello puede ocasionar, a nivel ambiental y de seguridad alimentaria [9]. El uso continuo de agroquímicos afecta la estructura del suelo, la fertilidad del mismo y genera acumulación de compuestos tóxicos en los cultivos [22],[28]. Una de las consecuencias más importantes, detectada después de algunos años de aplicación, es que *B. cinerea* se adapta y adquiere resistencia al fungicida utilizado [14]. Lo anterior, obliga a que el agricultor tenga que rotar y diversificar el uso de fungicidas, generando dificultades técnicas y un incremento en los costos de producción. El fenómeno de resistencia a fungicidas es de tal magnitud, que en Estados Unidos se han encontrado cepas de *B. cinerea* que son resistentes a todos los tipos de fungicidas recomendados por el Comité de Acción de Resistencia a los Fungicidas (FRAC) para el control del moho gris [10].

El control biológico es la alternativa más recomendable. Los organismos más ampliamente estudiados tanto por su capacidad antagonista como por compartir hábitat con los fitopatógenos, son los hongos de la división Ascomycota [7],[12],[32]. En múltiples estudios, *Trichoderma* ha demostrado ser un excelente biocontrolador; de hecho, el primer producto de control biológico aplicado comercialmente para combatir *B. cinerea* en fresa, en sistemas de producción de invernadero, fue *Trichoderma harzianum* (aislado T-39) [5]. *Trichoderma* contiene numerosas especies de importancia económica en diferentes ámbitos: industria, biorremediación, o como bioefectores en biofertilizantes y bioplaguicidas [7],[30],[18]. Dentro de las especies más importantes, que han sido reportadas como agentes controladores biológicos y que han sido la base para el desarrollo de productos comerciales tenemos: *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. viride*, y *T. polysporum* [5],[30],[19]. *Trichoderma* ha demostrado una gran capacidad para controlar *B. cinerea*, ya sea mediante mecanismos específicos de interacción directa entre los dos hongos, o mediante estrategias

que implican una respuesta indirecta de defensa sistémica de la planta [19]. No obstante, una de las desventajas de los microorganismos usados como controladores biológicos consiste en su adaptación a las condiciones del cultivo que es objeto del tratamiento. Por tal razón, el aislamiento, estudio y aplicación de cepas nativas constituye una estrategia que puede conseguir mejores resultados [23]. Por lo anterior, este trabajo presenta los resultados de un análisis comparativo, realizado en condiciones de laboratorio, entre un producto comercial para el control biológico basado en *Trichoderma* spp. y cepas nativas de *Trichoderma* sp. aisladas de suelos de cultivo en Norte de Santander, para controlar el hongo fitopatógeno causante del moho gris.

2. Materiales y métodos

2.1 Aislamiento del agente fitopatógeno

A partir de plantas enfermas, se recolectaron frutos de fresa con lesiones típicas del moho gris. Los aislamientos se realizaron con una aguja estéril, mediante transferencia directa de micelio y conidios del tejido del fruto afectado, a placas Petri con medio de cultivo sólido Agar Papa Dextrosa (PDA) [2]. Las placas fueron incubadas en oscuridad, durante 5 días a 25 ± 1 °C. A partir de las colonias aisladas se obtuvieron cultivos monospóricos en PDA.

Las cepas aisladas y purificadas fueron caracterizadas según su morfología macroscópica y microscópica, siguiendo criterios taxonómicos macroscópicos junto con las observaciones microscópicas de conidióforos, esclerocios y conidios, que corresponden a las descripciones reportadas para el género *Botrytis* [21],[24]. La patogenicidad de los aislados fue verificada en frutos de fresa sanos, como indica [11]. Los conidios de la cepa causante del moho gris, fueron recolectados y almacenados en una solución de glicerol (40%) a -20°C. Para efectos del presente trabajo, la cepa patógena fue codificada como BC.

2.2 Producto comercial

Como punto de referencia en los análisis, se utilizó el producto comercial para control biológico FITOTRIPEN WP (*Trichoderma* spp., 1×10^8 esporas/gramo, 95 % pureza), con registro ICA N° 4658, y elaborado por Natural Control (La Ceja, Antioquia). Este producto fue adquirido en un establecimiento distribuidor de productos agroquímicos de la ciudad de Pamplona. Para efectos del presente trabajo, fue denominado FT.

2.3 Aislamiento de las cepas nativas de *Trichoderma* sp.

Las cepas antagonistas fueron aisladas a partir de muestras de suelo de cultivo. Los sitios de muestreo se ubicaron en dos fincas de producción agrícola cuya descripción se hace a continuación. De una parte, la finca “El Cascajal”, con

coordenadas 7°20'46.0" N, - 72°39'29.6" W, y una altitud de 2320 m.s.n.m. Esta finca está localizada en la Vereda Monte dentro del municipio de Pamplona, Norte de Santander. De otra parte, el predio "La Morena Linda", con coordenadas 8° 02'28,17" N, - 72°52'06,91" W, y una altitud de 1552 m.s.n.m. Este predio está ubicado en el municipio de Bucarasica, Norte de Santander.

El procedimiento de toma de muestras se realizó en zigzag dentro de la zona del cultivo, recolectando suelo a una profundidad de 20 -30 cm, empleando para ello un barreno de cultivos. Muestras de aproximadamente 300 g se almacenaron en recipientes estériles, que se mantuvieron bajo condiciones de refrigeración hasta ser procesadas. Cada muestra fue procesada según lo sugerido por [27]. A partir de colonias aisladas se obtuvieron cultivos monospóricos en PDA, los cuales fueron almacenados y conservados en una solución de glicerol (40%) a -20°C [1].

2.4 Caracterización fenotípica de las cepas nativas

Cultivos axénicos de los aislamientos fueron analizados a nivel macroscópico y microscópico. La caracterización fenotípica se realizó usando el anamorfo de las cepas y siguiendo lo sugerido por [13],[16]. Características microscópicas como morfología, tamaño y disposición de los conidios y fiálides, también fueron consideradas. Las cepas nativas descritas en este trabajo fueron denominadas TN01 y TN02. De otra parte, la tasa de crecimiento apical *in vitro* se determinó en medio PDA, según metodología propuesta por [31], por triplicado en tres experimentos independientes.

2.5 Evaluación de la actividad antagonista *in vitro*

La evaluación de la acción antagónica de los biocontroladores contra el fitopatógeno, se realizó mediante el enfrentamiento en cultivo dual de los dos microorganismos (patógeno - antagonista) en placas de Petri de 90 mm de diámetro sobre medio de cultivo PDA. Los enfrentamientos se configuraron de la siguiente manera: TN01+BC, TN02+BC y FT+BC. Tanto el patógeno, como el antagonista, fueron inoculados por punción de manera equidistante del borde de la placa a 1cm sobre el medio de cultivo, según lo indica [27]. En cada uno de los enfrentamientos se utilizaron cuatro placas Petri: tres con el antagonista y una placa control sin el antagonista. El experimento se desarrolló bajo un diseño completamente aleatorizado, con tres réplicas por cada uno de los tratamientos, con sus correspondientes controles. Los ensayos fueron repetidos en tres ocasiones diferentes. La unidad experimental estuvo representada por una placa Petri con medio PDA. Las placas con los microorganismos se incubaron en oscuridad a 25°C ± 1°C. La medición del diámetro y radio de las colonias fúngicas en crecimiento se hizo cada 24 h durante 12 días, con la ayuda de un calibrador "Pie de Rey".

La competencia por espacio y nutrientes fue evaluada mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), usando la siguiente fórmula $PICR = \frac{R1-R2}{R1} \times 100$; donde R1 es el radio del patógeno en condiciones control y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento [7]. El PICR fue calculado a los 6 y 12 días de enfrentamiento.

El grado de antagonismo fue evaluado al final de los ensayos, considerando la proporción de invasión del antagonista sobre la superficie del micelio de la colonia del fitopatógeno. Para ello se usó la escala cualitativa propuesta por [8] (Tab.1). El seguimiento de los enfrentamientos se realizó de dos maneras: mediante observación directa de las placas, como ya fue descrito, y a través de observaciones microscópicas (microscopio óptico ZEISS). Para las observaciones microscópicas se tomaron secciones de 2x2 mm de medio de cultivo de la zona de interacción y se observaron al microscopio óptico.

Tabla 1. Escala cualitativa de evaluación del grado de antagonismo *in vitro*.

Capacidad antagónica	
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno
1	Invasión de 1/4 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
2	Invasión de 1/2 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno y esporulación sobre ella.

2.6 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron bajo un diseño completamente aleatorizado, con tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. La normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de rangos múltiples de Tukey utilizando el paquete estadístico SPSS versión 23. El nivel de significancia utilizado para todas las pruebas fue del 5% ($p < 0,05$).

3. Resultados y discusión.

3.1 Aislamiento y caracterización morfológica del hongo fitopatógeno.

En las plantas enfermas, se observaron flores con lesiones de color café en los pétalos y el pedúnculo (Fig.1A). En el caso de los frutos, las lesiones implicaron una coloración marrón en zonas blandas y deprimidas, que posteriormente se cubrieron con un color grisáceo (Fig.1B). Estas lesiones corresponden a las lesiones típicas causadas por *B. cinérea* [25]. A partir de los frutos lesionados se obtuvieron colonias aisladas en medio PDA.

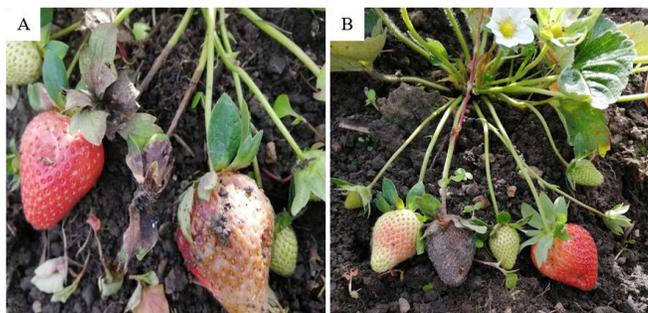


Figura 1. Plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) con signos de la enfermedad causada por *B. cinerea*. A. Lesiones típicas en flores. B. Lesión clásica en el fruto.

Las colonias formaron micelios aéreos blancos grisáceos esponjosos en PDA, cubriendo la placa Petri después de 5 días a 25°C en oscuridad. Después de 7 días de incubación se observaron conidióforos con conidios maduros y el micelio adquirió una tonalidad grisácea. Posteriormente el micelio pasó a una coloración ocre-marrón y, después de 14 días, se observaron esclerocios negros de morfología plano convexos (Fig.2A). La longitud de estos esclerocios varió entre 1,0 - 4,8 mm; con un ancho entre 1,0 y 5,5 mm. A nivel microscópico se observaron hifas septadas. Los conidióforos estaban ramificados, solitarios o agrupados, de color gris a marrón en su parte superior, con una longitud de 610 - 2000 μm y un ancho de 5 - 15 μm (Fig.2B). De otra parte, se observaron conidios unicelulares, hialinos a marrón claro y con forma ovalada. El tamaño de los conidios osciló entre 6,5 a 14 μm de largo por 4 a 6 μm de ancho.

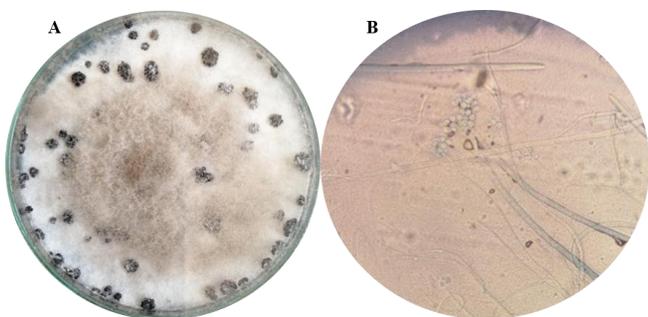


Figura 2. Caracterización morfológica de la cepa BT (*Botrytis* sp.). A. Colonia del aislado BC en Agar PDA, incubado en oscuridad a 25°C durante 14 días. Se aprecia la coloración típica del micelio y la presencia de esclerocios. B. Observación microscópica en fresco con un aumento de 400X. Hifas hialinas septadas y conidióforo con conidios ovalados.

Según los criterios taxonómicos usados, la cepa descrita pertenece al género *Botrytis*. La descripción fue consistente con reportes previos de *B. cinerea* [21],[24]. La cepa así obtenida y caracterizada fue denominada BC para los análisis posteriores.

3.2 Descripción morfológica del producto comercial.

El producto comercial fue sembrado en medio Agar PDA y su morfología fue descrita según lo indicado por [13]. En los

primeros días de cultivo se observó que el micelio aéreo fue hialino a blanco, con aspecto variable entre aracnoideo a lanoso. Con el paso de los días, la esporulación se evidenció por la formación de pústulas compactas en diferentes tonos de verde (verde limón a verde oscuro), sin un claro patrón concéntrico. A los 14 días la parte central de la colonia presentó una variación en su coloración tornándose a un blanco grisáceo y amarillento (Fig.3A). Al microscopio se encontraron conidióforos con frecuentes ramificaciones laterales, mientras que las fíalides fueron de lageniformes a ampuliformes. Por su parte los conidios presentaron paredes variables y con diversidad de formas, desde ovoides hasta globosos (Fig.3B). En la segunda semana de cultivo se observaron clamidosporas de forma variable en ramas laterales cortas de hifas vegetativas, de un color amarillo pálido, tonalidad que fue transmitida al micelio después de dos semanas de incubación (Fig.3A).

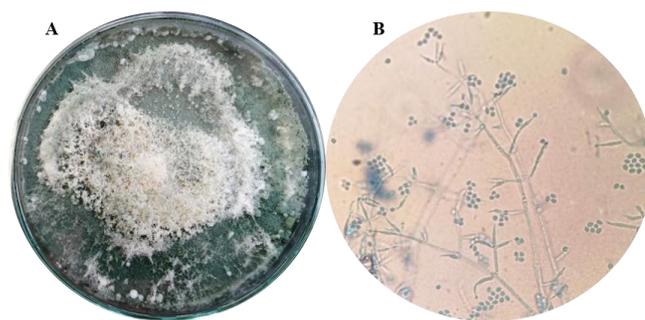


Figura 3. Morfología macroscópica y microscópica del agente biológico del producto comercial. A. Crecimiento en Agar PDA, incubado en oscuridad a 25°C durante 14 días. Se aprecia la coloración típica derivada de la presencia de clamidosporas. B. Observación de conidióforos y conidios en montaje en fresco con tinción de azul de lactofenol. Aumento 400X.

La variabilidad en las características observadas, tanto a nivel macroscópico como microscópico, permitió establecer que el producto comercial analizado efectivamente contiene una mezcla de dos o más especies, tal y como se declara en la ficha técnica. Sin embargo, el análisis fenotípico confirmó que, en cualquier caso, se trata de especies pertenecientes a la “sección *Trichoderma*” del género *Trichoderma*. En ocasiones, a nivel experimental en campo, la aplicación de consorcios o mezclas de varios microorganismos presentan mejores resultados que el uso de una única especie [6], por ello se encuentran en el mercado productos basados en mezclas de especies de biocontroladores. Para efectos del presente trabajo, este agente biológico fue denominado FT.

3.3 Aislamiento y caracterización fenotípica de las cepas nativas de *Trichoderma* sp.

El aislamiento se hizo a partir de muestras de suelo de dos fincas de producción agrícola (ver materiales y métodos). De cada una de estas fincas se obtuvo una cepa candidata en condiciones axénicas, para ser evaluada. Estas cepas fueron denominadas TN01 (Pamplona) y TN02 (Bucarasica). La

caracterización fenotípica se realizó siguiendo lo sugerido por [13] y [16].

El análisis fenotípico de la cepa TN01 permitió establecer que, en medio PDA, presenta un micelio aéreo algodonoso, de rápido crecimiento vegetativo y que gana en densidad con el tiempo. Su coloración es blanca tanto por el anverso como por el reverso (Fig.4A). En la segunda semana de incubación se genera un patrón concéntrico de esporulación con un borde blanco y un centro con escaso micelio aéreo. De otra parte, se observaron conidióforos mono y biverticilados simétricos, los principales con una longitud entre 30- 100 μm y un ancho de 1- 2 μm , y los secundarios con una longitud entre 12- 30 μm y un ancho de 2 μm . Los conidióforos pueden formar ángulos agudos a rectos con las hifas centrales (Fig.4B). Las fiálides presentaron forma de botella con un ancho de 1- 2 μm y un largo entre 5- 10 μm , con conidios verde claro de cilíndricos a elipsoidales de 3- 4 μm de largo y un ancho de 2- 3 μm .

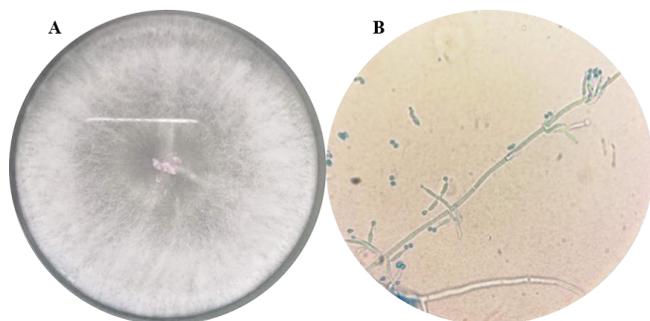


Figura 4. Características fenotípicas de la cepa TN01. A. Crecimiento en Agar PDA, incubado en oscuridad a 25°C durante 7 días. Fenotipo de rápido crecimiento. B. Observación de conidióforos en montaje en fresco con tinción de azul de lactofenol. Aumento 400X.

Las características fenotípicas permiten inferir que se trata de una cepa perteneciente al clado *Viride* [13],[26]. El análisis de la velocidad de crecimiento y las características microscópicas permiten proponer que la cepa pertenece al subclado *Koningii* [19].

En el caso del análisis morfológico de la cepa TN02, se observó micelio blanco, algodonoso a flocoso, abundante en el centro de la colonia. La esporulación le confirió un color verde oscuro y abundante micelio aéreo color blanco (Fig.5A). En el análisis microscópico se pudo determinar la presencia de hifas septadas hialinas, con un ancho entre 4- 5 μm , además de conidióforos mono y biverticilados simétricos (Fig.5B). Las fiálides tuvieron forma de pino con un ancho de 3 μm y un largo entre 6- 12 μm . Los conidios fueron subglobosos a elipsoidales cortos, con un largo entre los 3- 5 μm y un ancho de 3 μm . Los conidios maduros adoptaron un color verde oscuro. Estas características fenotípicas permitió ubicar al aislado TN02 dentro del clado *Viride* [13],[26]. Posteriormente, el análisis de las características morfológicas, a nivel microscópico, y según los criterios

taxonómicos basados en el anamorfo permite postular que la cepa TN02 hace parte del subclado *Viride* de este género[19].

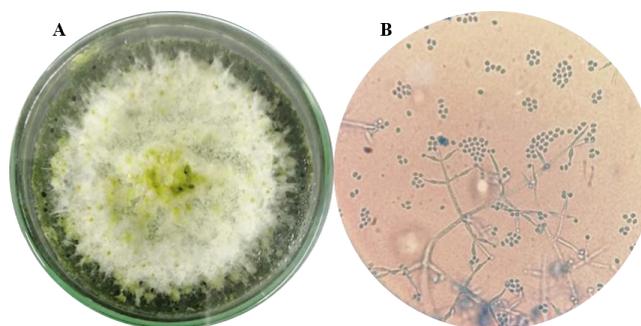


Figura 5. Características fenotípicas de la cepa TN02. A. Crecimiento en Agar PDA, incubado en oscuridad a 25°C durante 14 días. Se observa el borde verde oscuro. B. Observación de conidióforos, fiálides y conidios en montaje en fresco con tinción de azul de lactofenol. Aumento 400X.

Cabe mencionar que, en la última revisión a gran escala de la taxonomía del género *Trichoderma*, se redefinió el clado *Viride* anteriormente sección *Trichoderma* [19],[26]. Por lo que actualmente este clado es el más amplio y diverso del género. De otra parte, la elevada homoplasia morfológica del estado sexual, dificulta la identificación en el género *Trichoderma*, esto hace que las características fenotípicas del estado asexual (anamorfo) sean fundamentales para identificar taxonómicamente una cepa [26]. Debido a lo anterior, en el presente trabajo las aproximaciones taxonómicas de ambas cepas (TN01 y TN02) se han realizado con el fenotipo de su anamorfo. La identificación a nivel de especie se debe realizar en conjunto con los datos de secuencias moleculares y está fuera del alcance del presente trabajo.

3.4 Determinación de las tasas de crecimiento vegetativo.

Adicionalmente, y de manera complementaria a la caracterización fenotípica, se realizó un análisis comparativo de la velocidad de crecimiento apical en PDA (Tab.2). Se evaluaron las cuatro cepas usadas en este trabajo. De todas ellas, las cepas TN01 y TN02 (nativas de *Trichoderma* sp.) fueron claramente las de mayor velocidad de crecimiento; de hecho, la cepa TN01 registró la tasa más elevada de crecimiento ($p < 0,05$), lo cual es consistente con las características del subclado taxonómico (*Koningii*) en el que fue ubicada [30]. Por su parte, el agente biológico del producto comercial, mostró una elevada variación en los datos de velocidad, comportamiento que refleja la heterogeneidad de su composición. Finalmente, el agente fitopatógeno (*Botrytis* sp.) presentó los valores más bajos de crecimiento vegetativo ($p < 0,05$), lo cual se puede constituir en una desventaja para los ensayos “*in vitro*”. La tasa de crecimiento en medios de cultivo sólido, por parte de aislados de *B. cinerea* es muy variable; [3] reportaron cepas que mostraron una gran variabilidad en sus tasas de crecimiento en PDA y MEA. Sin embargo, para el género *Botrytis*, la tasa

de crecimiento de la cepa BC se considera una velocidad habitual de crecimiento si la comparamos con tasas reportadas en estudios recientes para *B. cinerea*, en similares condiciones a las de este trabajo [20].

Tabla 2. Tasas de crecimiento apical de las cepas objeto de estudio.

Cepa fúngica	Promedio (mm/h)	Desviación estándar
TN01 (<i>Trichoderma</i> sp.)	0,8225 ^a	0,0237
TN02 (<i>Trichoderma</i> sp.)	0,6811 ^b	0,0445
FT (Producto comercial)	0,6021	0,0863
BC (<i>Botrytis</i> sp.)	0,4934 ^c	0,0518

Fuente: Autores

3.5 Evaluación de la actividad antagonista “in vitro”

Con el fin de comparar las capacidades biocontroladoras del producto comercial FT con las cepas nativas (TN01 y TN02) se realizaron bioensayos duales en medio PDA. Al analizar los datos de PICR obtenidos al sexto día de incubación, se pudo establecer que la cepa TN02 mostró la menor capacidad antagonista *in vitro*, con valores de PICR cercanos al 40%; mientras que la cepa TN01 demostró poseer la mayor actividad antagonista con aproximadamente un 75% de PICR (Fig.6). Por su parte, el producto comercial registró valores de PICR en torno al 52%. Si comparamos estos resultados con los obtenidos al decimosegundo día, podemos constatar que el PICR se incrementó, especialmente con las cepas TN02 y FT; sin embargo, el potencial antagonista de cada cepa en relación con las demás no presentó cambios. Así, se observó como la cepa TN01 conseguía valores de inhibición ligeramente superiores al 80%, mientras que el producto comercial de referencia apenas conseguía promediar valores cercanos al 70%. En el caso de TN02, los datos de PICR estuvieron en torno a un 55%, corroborando su menor capacidad antagonista.

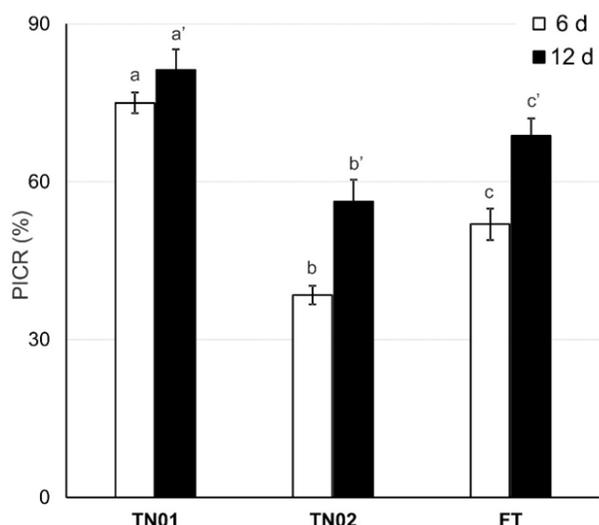


Figura 6. Comparación del efecto antagonista, medido como %PICR, de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. (TN01 y TN02) y un producto comercial (FT), contra *Botrytis* sp.

Fuente: Autores

En síntesis, la cepa nativa TN01 demostró una mayor actividad antagonista *in vitro* que el producto comercial (FT), y éste a su vez presentó mejor antagonismo que la cepa TN02 (Fig.6).

Adicionalmente, el grado de antagonismo se determinó cualitativamente usando una escala de criterios usada por [8] que establece 5 grados, desde 0 hasta un máximo de 4 (Tab.1). Al analizar los resultados de la aplicación de esta escala, se observó que los antagonistas TN01 y FT alcanzaron un antagonismo grado 4, que se manifestó con la invasión total de la superficie de la colonia del fitopatógeno, esporulando sobre ella (Tab.3). No obstante, TN01 mostró un mayor poder antagonista ya que al cuarto día de incubación había colonizado completamente la superficie de la colonia de *Botrytis* sp.; mientras que el producto FT consiguió colonizar y esporular sobre la colonia del fitopatógeno, después de 12 días de incubación. Por su parte, y en concordancia con lo presentado en la Fig. 6, la cepa TN02 mostró la menor capacidad antagonista con una valoración de 0, lo que implica que no consiguió ningún tipo de invasión de la superficie de la colonia de *Botrytis* sp. (Tab.3).

Tabla 3. Grado de antagonismo de las cepas de *Trichoderma*

Antagonista	Grado	Capacidad antagonista
TN02 (<i>Trichoderma</i> sp.)	0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia de <i>Botrytis</i> sp.
FT (Producto comercial)	4	Invasión total de la superficie de la colonia de <i>Botrytis</i> sp. y esporulación sobre ella
TN01 (<i>Trichoderma</i> sp.)	4	Invasión total de la superficie de la colonia de <i>Botrytis</i> sp. y esporulación sobre ella

Fuente: Autores

Muchas especies del género *Trichoderma* han mostrado una buena capacidad para controlar *B. cinerea*, ya sea mediante mecanismos indirectos, de resistencia sistémica de la planta inducida por el antagonista, o por mecanismos específicos de interacción directa [18]. Estos últimos, son los mecanismos que se ponen a prueba en los ensayos duales en medios de cultivo; entre estos, los más frecuentes son: la competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo y, la producción de metabolitos y enzimas [19]. Si bien, el grado de antagonismo alcanzado por el producto comercial y, en especial, por la cepa TN01, permitió suponer que el micoparasitismo hacía parte del efecto antagonista observado, las observaciones microscópicas no permitieron confirmar fehacientemente esta hipótesis. Además, cabe señalar que TN01 fue la cepa de mayor tasa de crecimiento apical en PDA (Tab.2), lo que posiblemente favoreció una rápida respuesta frente al fitopatógeno y le permitió competir nutricionalmente de mejor manera logrando un PICR de 75% al sexto día de ensayo, valor que el producto comercial apenas pudo conseguir después de doce días de incubación. Así las cosas, se postuló que la cepa TN01 compite

eficientemente por nutrientes y espacio en el medio de cultivo utilizado y que la invasión de la colonia de *Botrytis* sp. puede estar mediada por la producción de metabolitos y/o enzimas que afectan al fitopatógeno. Sin embargo, la comprobación experimental de esta última hipótesis, está fuera del alcance del presente trabajo.

4. Conclusiones

Se describieron morfológicamente dos cepas nativas aisladas de zonas agrícolas de los municipios de Pamplona (TN01) y Bucarasica (TN02). El análisis fenotípico permitió establecer con certeza que ambas cepas pertenecen al clado *Viride* del género *Trichoderma*. Adicionalmente, características fenotípicas específicas permiten postular que la cepa TN01 pertenece al subclado *Koningii*, mientras que la cepa TN02 se ubica en el subclado *Viride*.

Los enfrentamientos duales revelaron que la cepa con mayor potencial para ser usada como controlador biológico de *Botrytis* sp. fue la cepa nativa TN01. Los resultados indican que su capacidad antagonica, no sólo es claramente superior a la cepa TN02, sino que además superó al producto comercial de referencia con el cual fueron comparadas. Estos resultados nos permiten considerar el uso de TN01 en experimentos en condiciones de campo abierto, para constatar el potencial demostrado en el laboratorio.

Agradecimientos

Los autores agradecen al grupo de investigación GIMBIO, a la Facultad de Ciencias Agrarias y a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Pamplona por el apoyo recibido en el desarrollo de este trabajo.

Referencias

- [1] Aldana Bohórquez, S.M. and García Rico, R.O. 2019. Efecto de diferentes condiciones de estrés sobre el crecimiento vegetativo del hongo filamentososo *Acremonium chrysogenum*. BISTUA REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS. 17, 2 (Aug. 2019), 182–195. <https://doi.org/10.24054/bistua.v17i2.248>.
- [2] Azevedo, D.M.Q., Martins, S.D.S., Guterres, D.C., Martins, M.D., Araújo, L., Guimarães, L.M.S., Alfenas, A.C., Furtado, G.Q., 2020. Diversity, prevalence and phylogenetic positioning of *Botrytis* species in Brazil. Fungal Biol. 124, 940–957. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.08.002>
- [3] Brankica, T., Delibašić, G., Milivojević, J., Nikolić, M., 2009. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. Arch. Biol. Sci. 61. <https://doi.org/10.2298/ABS0903419T>
- [4] Cheung, N., Tian, L., Liu, X., Li, X., 2020. The Destructive Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*-Insights from Genes Studied with Mutant Analysis. Pathog. Basel Switz. 9, E923. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110923>
- [5] Cruz, A.F., Barka, G.D., Sylla, J., Reineke, A., 2018. Biocontrol of strawberry fruit infected by *Botrytis cinerea*: Effects on the microbial communities on fruit assessed by next-generation sequencing. J. Phytopathol. 166, 403–411. <https://doi.org/10.1111/jph.12700>
- [6] Debnath, S., Chakraborty, G., Dutta, S.S., Chaudhury, S.R., Das, P., Saha, A.K., 2020. Potential of *Trichoderma* species as biofertilizer and biological control on *Oryza sativa* L. cultivation. Biotechnol. Veg. 20, 1–16.
- [7] Díaz de la Osa A, Almenares Casanova M, Fernández Millares B, Aguado Casas ME, Rojas L, Zeilinger S, Hernández-Rodríguez A. Secondary metabolites and extracellular proteases contribute to the antagonistic action of indigenous *Trichoderma* strains against *Botrytis cinerea*. Fungal Biol. 2025 Feb;129(1):101530. doi: 10.1016/j.funbio.2024.101530. Epub 2024 Dec 31. PMID: 39826978.
- [8] Elías, R., Arcos, O., Arbeláez, G., 1993. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* aisladas de suelos colombianos en el control de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Agron. Colomb. 10, 52–61.
- [9] Fernandes, V.C., Maia, M.L., Correia Sá, L., Sousa, S., Paíga, P., Vera, J.L., Domingues, V.F., Delerue-Matos, C., 2021. Extraction Procedures and Chromatography of Pesticides Residues in Strawberries, in: Inamuddin, Ahamed, M.I., Lichtfouse, E. (Eds.), Sustainable Agriculture Reviews 47: Pesticide Occurrence, Analysis and Remediation Vol. 1 Biological Systems, Sustainable Agriculture Reviews. Springer International Publishing, Cham, pp. 167–201. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54712-7_5
- [10] Fernández, O. D., Grabke, A., Li, X., Schnabel, G., 2015. Independent Emergence of Resistance to Seven Chemical Classes of Fungicides in *Botrytis cinerea*. Phytopathology® 105, 424–432. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0161-R>
- [11] Fernández, O. D., Li, X.P., Wang, F., Schnabel, G., 2012. First Report of Gray Mold of Strawberry Caused by *Botrytis caroliniana* in North Carolina. Plant Dis. 96, 914–914. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1018-PDN>
- [12] García-Rico, R.O. and Fierro, F., 2017. Papel de las subunidades alfa de proteínas G en los procesos morfogénicos de hongos filamentosos de la división Ascomycota. Rev. Iberoam. Micol. 34, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.06.005>
- [13] Harman, G.E., Kubicek, C.P., 2002. *Trichoderma* And *Gliocladium*. Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. CRC Press.
- [14] He, L., Cui, K., Li, T., Song, Y., Liu, N., Mu, W., Liu, F., 2020. Evolution of the Resistance of *Botrytis cinerea* to Carbendazim and the Current Efficacy of Carbendazim Against Gray Mold After Long-Term Discontinuation. Plant Dis. 104, 1647–1653. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2457-RE>
- [15] Isaza, L., Zuluaga, Y.P., Marulanda, M.L., 2019. Morphological, pathogenic and genetic diversity of *Botrytis cinerea* Pers. in blackberry cultivations in Colombia. Rev. Bras. Frutic. 41. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019490>
- [16] Jaklitsch, W.M., 2009. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. Stud. Mycol., European species of Part I. The green-spored species 63, 1–91. <https://doi.org/10.3114/sim.2009.63.01>
- [17] Jaklitsch, W.M., Voglmayr, H., 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. Stud. Mycol., Hypocrealean lineages of industrial and phytopathological importance 80, 1–87. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001>
- [18] Kumari, R., Kumar, V., Koul, B., Abul Farah M, Mishra AK. 2025. Synergistic effects of *Trichoderma* and biochar on the biocontrol of two soil-borne phytopathogens in chickpeas. Front Microbiol. 1;16. doi: 10.3389/fmicb.2025.1583114.
- [19] Martínez Y, Ribera J, Schwarzer FWMR, De France K. Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. Appl Microbiol Biotechnol. 2023 Sep;107(18):5595-5612. doi: 10.1007/s00253-023-12687-x. Epub 2023 Jul 21. PMID: 37477696; PMCID: PMC10439859.
- [20] Meng, L., Mestdagh, H., Ameye, M., Audenaert, K., Höfte, M., Van Labeke, M.-C., 2020. Phenotypic Variation of *Botrytis cinerea* Isolates Is Influenced by Spectral Light Quality. Front. Plant Sci. 0. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01233>
- [21] Mirzaei, S., Goltapeh, E.M., Shams-Bakhsh, M., Safaie, N., 2008. Identification of *Botrytis* spp. on Plants Grown in Iran. J.

- Phytopathol. 156, 21–28. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01317.x>
- [22] Moreno P, D. M. ., Rivera, M. E. ., Delgado R, J. R. ., & Vargas C. M. J. . (2017). Modelación del transporte de plaguicidas e insecticidas en suelos de cultivo de arveja con el software Hydrus-1D en vereda el Escorial, Pamplona Norte de Santander. BISTUA REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS,15(2),29–35. <https://doi.org/10.24054/bistua.v15i2.621>
- [23] Nessma, E., Mohamed, E., Nadia, A y Yehia, M. 2025. Biocontrol potential of endophytic *Trichoderma harzianum* AUMC 14897 against Fusarium seedling blight disease in oat. Zawawy et al. BMC Plant Biology. 25:586, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06517-7>
- [24] Pei, Y., Tao, Q., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Li, Z., Qi, X., Xu, J., Zhang, M., Chen, H., Chang, X., Tang, H., Sui, L., Gong, G., 2019. Phenotypic and Genetic Characterization of *Botrytis cinerea* Population from Kiwifruit in Sichuan Province, China. Plant Dis. 103, 748–758. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0707-RE>
- [25] Petrasch, S., Knapp, S.J., Kan, J.A.L. van, Blanco-Ulate, B., 2019. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. Mol. Plant Pathol. 20, 877–892. <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>
- [26] Qin, W.-T., Zhuang, W.-Y., 2016. Seven wood-inhabiting new species of the genus *Trichoderma* (Fungi, Ascomycota) in Viride clade. Sci. Rep. 6, 27074. <https://doi.org/10.1038/srep27074>
- [27] Rabasco, L., Porras, E., Possas, A., Morcillo, R y Pérez, F.2025. Un enfoque predictivo para reducir el desperdicio poscosecha de fresa: Impacto de las condiciones de almacenamiento y la actividad del agua en la germinación de *Botrytis cinerea*. Investigación alimentaria internacional.210. 1-11 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116401>
- [28] Rodríguez V., R., & Rodríguez B., M. (2019). Biorremediación de suelo de la chinampa ubicada en Cuernavaca delegación Xochimilco, D.F contaminado con plaguicidas empleando *Penicillium* sp. BISTUA REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS, 17(1), 48–58. <https://doi.org/10.24054/bistua.v17i1.270>
- [29] Ribeiro, U y Lima, J. 2025. Lecciones de campo: *Trichoderma* en la agricultura y la salud humana. Revista Canadiense de Microbiología. 71. 1-15. <https://doi.org/10.1139/cjm-2024-0227> amaniego-Fernández, L.M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A.J., Placeres-Espinosa, I., Samaniego-Fernández, L.M., Harouna, M., Corbea, O., Rondón-Castillo, A.J., Placeres-Espinosa, I., 2018. Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. Rev. Protección Veg. 33.
- [30] Samuels, G.J., Dodd, S.L., Lu, B.-S., Petrini, O., Schroers, H.-J., Druzhinina, I.S., 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. Stud. Mycol. 56, 67–133. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03>
- [31] Torrent C, Gil-Durán C, Rojas-Aedo JF, Medina E, Vaca I, Castro P, García-Rico RO, Cotoras M, Mendoza L, Levicán G, Chávez R. Role of *sfk1* Gene in the Filamentous Fungus *Penicillium roqueforti*. Front Microbiol. 2017 Dec 6;8:2424. doi: 10.3389/fmicb.2017.02424. PMID: 29270163; PMCID: PMC5723657.
- [32] Woo SL, Hermosa R, Lorito M, Monte E. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. Nat Rev Microbiol. 2023 May;21(5):312-326. doi: 10.1038/s41579-022-00819-5. Epub 2022 Nov 22. PMID: 36414835.